



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología

**Diseño y construcción de partículas pseudovíricas
(VLPs) generadas a partir de la fibra 2 de *Fowl*
Adenovirus serotipo 4**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Ray William IZQUIERDO LARA

ASESORES

Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Iván Karlos BEST CUBA (Coasesor)

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Izquierdo, R. (2016). *Diseño y construcción de partículas pseudovíricas (VLPs) generadas a partir de la fibra 2 de Fowl Adenovirus serotipo 4*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

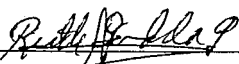
Siendo las 11:15 horas del 07 de octubre de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de RAY WILLIAM IZQUIERDO LARA.

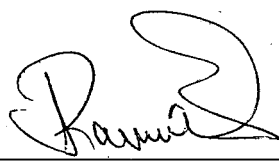
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 003-EAPGB-2016, el titulando expuso su tesis: **"DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVÍRICAS (VLPs) GENERADAS A PARTIR DE LA FIBRA 2 DE FOWL ADENOVIRUS SEROTIPO 4"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.9..., calificativo: Sobresaliente con mención...

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a RAY WILLIAM IZQUIERDO LARA y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.


Siendo las 12:45 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 07 de octubre de 2016.


Mg. RUTH GARCIA DE LA GUARDA
(PRESIDENTA)


Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(ASESOR)


Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(MIEMBRO)


Blgo. ERASMO COLONA VALLEJOS
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento:

Al profesor Dr. Pablo Ramirez Roca por su gran disposición en la asesoría del presente trabajo y sus sabios consejos. A mi asesor externo, el Dr. Iván que siempre estuvo presto a ayudar con su conocimiento y experiencia.

A la empresa Farmacológicos Veterinarios S.A.C. que financió este proyecto en su totalidad, y en especial al Sr. Manolo Fernández Díaz por confiar en esta investigación como primera etapa para el desarrollo de nuevas vacunas

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica de FARVET SAC, en especial a Ana Luz Chumbe, que me ayudó con el planteamiento, la ejecución e incluso con ideas para las discusiones del presente trabajo. También a Luis Tataje, Aling Figueroa y los demás por haberme ayudado en todo momento.

DEDICATORIA

A mis padres Henry Izquierdo Larrea y Rita Lara Burgos, por siempre apoyarme y guiarme con amor y dedicación.

A mis hermanos, hermanas, primos, primas y a mis pocos pero sinceros amigos por estar allí cuando los necesité y siempre estar animándome a salir adelante.

A mi gran amor, Ana Luz Chumbe, que no solo me ha enseñado muchos de los secretos de la biología molecular, sino que ha sido la inspiración para tratar cada día de ser una mejor persona en cada aspecto de la vida.

CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Contenido.....	iv
Índice de Tablas	vi
Índice de Figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Fowl Adenovirus (FAdV).....	3
2.1.1 Importancia de los FAdV.....	3
2.1.2 Clasificación de los FAdV.....	4
2.1.3 Estructura de los FAdV.....	4
2.1.4 Función de la Fibra-2 y su rol en la patogenicidad de FAdV...	5
2.1.5 Vacunas convencionales y experimentales.....	7
2.2 Partículas Similares a Virus (VLP).....	8
2.2.1 Tipos de VLPs.....	9
2.2.1.1 VLPs de virus estructuralmente simples.....	9
2.2.1.2 VLPs con múltiples capas de proteínas.....	9
2.2.1.3 VLPs de virus con envolturas lipídicas.....	9
2.2.2 Propiedades Inmunogénicas de los VLPs.....	10
2.2.2.1 VLPs y la inducción de la Respuesta Humoral.....	11
2.2.2.2 VLPs, células Dendríticas y la Respuesta Celular Inmune Innata y Adaptativa.....	11
2.2.3 NDV como plataforma para generar VLP.....	12
2.2.3.1 Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).....	12
2.2.3.2 Generación de VLP a partir de NDV.....	13
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
3.1 Hipótesis	15

3.2	Objetivo General	15
3.3	Objetivos Específicos	15
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	16
4.1	Material Biológico	16
4.2	Metodología	17
4.2.1	Construcción de los vectores plasmídicos	17
4.2.1.1	Diseño del gen quimérico hnFib2	17
4.2.1.2	Clonamiento de los vectores plasmídicos	18
4.2.1.3	Secuenciación	23
4.2.2	Estandarización de la Transfección	25
4.2.2.1	Preparación del PEI25	25
4.2.2.2	Mantenimiento y sembrado de células DF-1	26
4.2.2.3	Transfección	27
4.2.2.4	Microscopía de Fluorescencia	28
4.2.2.5	Citometría de Flujo	28
4.2.2.6	Análisis estadístico	29
4.2.3	Expresión de VLP	29
4.2.3.1	Transfección a gran escala	29
4.2.3.2	Purificación de los VLP	30
4.2.3.3	Western Blot	31
5.	RESULTADOS	36
5.1	Verificación de la construcción de los vectores plasmídicos	36
5.2	Condiciones óptimas de transfección	39
5.3	Análisis de la expresión y ensamblaje de VLP	48
6.	DISCUSIÓN	52
7.	CONCLUSIONES	56
8.	RECOMENDACIONES	56
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
10.	ANEXO	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de <i>Fowl Adenovirus</i>	4
Tabla 2. Medios y soluciones de cultivo.....	16
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para el proceso de clonación.....	22
Tabla 4. Cantidad de células y volúmenes utilizados para sembrar los recipientes antes de la transfección.....	27
Tabla 5. Volúmenes necesarios para la preparación de 2 geles de poliacrilamida.....	32
Tabla 6. Resumen de los datos obtenidos de la secuenciación de los plásmidos recombinantes.....	39
Tabla 7. Variaciones nucleotídicas de los plásmidos recombinantes.....	39
Tabla 8. Porcentaje de células que expresan EGFP.....	47
Tabla 9. Diferencia de medianas entre los grupos de células transfectadas.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de la cápside de Fowl Adenovirus serotipo-4 (FAdV-4).....	6
Figura 2. Esquema de la estructura y genoma de NDV.....	13
Figura 3. Predicción del dominio transmembrana de la proteína HN.....	18
Figura 4. Secuencia nucleotídica del gen hnFib2.....	19
Figura 5. Esquema de clonamiento de los vectores plasmídicos.....	21
Figura 6. Química de la pirosecuenciación.....	24
Figura 7. Estructura del PEI25 ramificado.....	26
Figura 8. Pasos de purificación de los VLPs.....	31
Figura 9. Armado del “sandwich” de transferencia.....	34
Figura 10. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los plásmidos digeridos.....	36
Figura 11. Ensamblaje de los plásmidos secuenciados.....	37
Figura 12. Mapa de los plásmidos secuenciados.....	38
Figura 13. Primer ensayo de transfección en células DF-1 observadas en fluorescencia.....	41
Figura 14. Primer ensayo de transfección en células DF-1 observadas bajo un microscopio con contraste de fase.....	42
Figura 15. Segundo ensayo de transfección en células DF-1 observadas en fluorescencia.....	43
Figura 16. Segundo ensayo de transfección en células DF-1 observadas bajo un microscopio con contraste de fase.....	44
Figura 17. Análisis por citometría de flujo.....	45
Figura 18. Análisis estadístico Kruskal-Wallis entre los grupos transfectados con PEI 25.....	47
Figura 19. Eficiencia de transfección con distintas proporciones de DNA/PEI25.....	48
Figura 20. Citotoxicidad del PEI 25 en células DF-1.....	49
Figura 21. Análisis de los VLP por Western blot usando suero anti-NDV....	50
Figura 22. Análisis de los VLP por Western blot usando suero anti-Fibra-2.....	51

RESUMEN

Fowl adenovirus serotipo 4 (FAdV-4) causa en pollos Hepatitis por cuerpos de inclusión (HCI) y Síndrome de Hidropericardio (SHP), generando pérdidas en la industria avícola. Actualmente, las vacunas contra FAdV no son totalmente efectivas y en ocasiones pueden revertir, por lo que es necesario desarrollar nuevas vacunas para controlar esta enfermedad. Por otro lado, las Partículas Similares a Virus (VLP) son nanoestructuras formadas de uno o más tipos de proteínas virales estructurales que emulan la estructura auténtica de los virus y que han mostrado ser excelentes inmunógenos incluso sin la necesidad del uso de adyuvantes. Sin embargo, FAdV es un virus sin envoltura y estructuralmente complejo, por lo que generar VLP de este virus es un desafío técnicamente muy difícil de realizar. Para superar este inconveniente hemos aprovechado la capacidad que tienen las principales proteínas estructurales del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), de tomar parte de la membrana del hospedero y autoensamblarse en viriones, para generar VLPs con envoltura conteniendo a la proteína Fibras-2 de FAdV-4. El primer paso fue estandarizar la técnica de transfección con polietilenimina de 25 kDa (PEI25) en células DF-1. La eficiencia media máxima de transfección, medida en porcentaje de células que expresan EGFP, fue de 61.07%, la cual se obtuvo utilizando 0.53 µg DNA más 1.59 µg de PEI25 por cm² de células sembradas en monocapa. Luego, se expresó simultáneamente las proteínas Matriz (M) y Nucleoproteína (N) de NDV, con la proteína quimérica hnFib2. Esta última compuesta de la proteína Fibras-2 de FAdV-4 fusionada en su extremo N-terminal a los dominios citoplasmático y transmembrana de la proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) de NDV, permitiendo la interacción de la Fibras-2 con la proteína M lo que facilita el ensamblaje de los viriones. Los VLPs purificados fueron evaluados por Western blot, obteniéndose bandas de ~40 kDa y ~55kDa positivas a suero anti-NDV correspondientes a las proteínas M y N, respectivamente; y a suero anti epítipo CDSATMGNRPGDLNS de Fibras-2 obteniendo una banda de ~63 kDa. Este es el primer trabajo de la obtención de VLP para FAdV, dando un paso importante en el desarrollo de la siguiente generación de vacunas contra este patógeno. Estos VLP necesitan ser probados a nivel inmunológico para determinar su eficiencia como vacuna candidata contra FAdV-4.

Palabras Clave: *Fowl Adenovirus*, Fibras-2, Partículas Similares a Virus (VLP), Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), transfección.

ABSTRACT

Fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) causes Inclusion body hepatitis (IBH) and Hydropericardium syndrome (HPS) in chickens, generating huge economic losses in the poultry industry. Current vaccines against FAdV are not completely effective and sometimes they may revert, which makes it necessary to develop better vaccines to control the disease. On the other hand, Virus-like particles (VLP) are nanostructures formed by one or more types of structural viral proteins that have showed to be excellent immunogens even without adjuvants. However, FAdV is a non-enveloped and structurally complex virus, which make its VLP development a technically hard challenge. To overcome this drawback, we took advantage of Newcastle disease virus (NDV) main structural proteins capacity to take part of the host membrane and self-assembly into virions, to generate FAdV-4 Fiber-2 containing enveloped VLPs. First, we standardized transfection with 25 kDa polyethylenimine (PEI25) in DF-1 cells. The maximum media transfection efficiency, measured by percentage of EGFP-expressing cells, was 61.07%, which was reached by using 0.53 μg of DNA with 1.59 μg of PEI25 per cm^2 of a cell monolayer. Next, NDV Matrix (M) and Nucleoprotein (N) proteins were expressed together with the chimeric protein hnFib2. The latter is composed of FAdV-4 Fiber-2 protein fused at the N-termini to cytoplasmic and transmembrane domains of the NDV Hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein, allowing the interaction of Fiber-2 with protein M to produce virions assembly. Purified VLPs were analyzed by Western Blot, obtaining ~40 kDa and ~55 kDa bands positive to anti-NDV serum corresponding to M and N proteins, respectively; and a ~63 kDa band positive to serum anti Fiber-2 epitope CDSATMGNRPGDLNS. This is the first report of VLP for FAdV, which represents an important step towards the next generation of vaccines against this pathogen. Nevertheless, this VLP needs to be tested at an immune response level to determine its efficiency as a FAdV-4 vaccine candidate.

Keywords: *Fowl Adenovirus*, Fiber-2, Virus-Like Particles (VLP), Newcastle disease virus (NDV), transfection.

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Amstrongs
AmpR	Gen de resistencia a la ampicilina
BSA	Albumina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
CMV	Citomegalovirus humano
cm ²	centímetros cuadrados
DC	Dominio citoplasmático
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT	Dominio transmembrana
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
emPCR	PCR en emulsión
FAdV	<i>Fowl Adenovirus</i>
FAdV-4	FAdV serotipo 4
HCI	Hepatitis por Cuerpos de Inclusión
HN	Hemaglutinina-neuraminidasa
HRP	Peroxidasa de rabano
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
KanR	Gen de resistencia a la kanamicina
kDa	Kilo daltons
mRNA	RNA mensajero
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ml	Mililitro
NDV	Virus de la enfermedad de newcastle
nm	Nanómetros
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> Fostafo Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEI	Polietilenimida
PEI25	Polietilenimida de 25kDa
RCF	Fuerza centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa

SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
SHP	Síndrome de Hidropericardio
siRNA	RNA de interferencia pequeño
SPF	Libre de patógenos específicos
ssDNA	DNA de cadena simple
TEMED	Tetrametiletilendiamina
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
V	voltios
VLP	Partículas pseudovíricas
w/v	peso/volumen

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por virus generan grandes pérdidas económicas en la industria avícola. Dentro de los virus emergentes más importantes para esta industria esta *Fowl Adenovirus* (FAdV), un virus endémico alrededor del mundo, que afecta a aves de corral, causante de Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI), bronquitis en codornices, Síndrome de hidropericardio (SHP), erosión de la molleja y necrosis pancreática (Steer et al. 2009). El Perú es un país endémico, donde el serotipo 4 (FAdV-4) es prevalente (Grgić et al. 2013).

FAdV-4 pertenece a la familia Adenoviridae, que se caracteriza por ser virus icosaédricos, sin envoltura y con un genoma de DNA de doble cadena (San Martín, 2012). En general, la cápside de FAdV es estructuralmente compleja, y contiene 4 proteínas estructurales principales: el Hexón, el Pentón, la Fibra-1 y la Fibra-2. De estas proteínas, la proteína Fibra-2 juega un rol principal en la entrada del virus a la célula huésped (Tan et al. 2001). Además, se ha demostrado que la Fibra-2 es capaz de generar una eficiente protección cuando se usa como proteína recombinante para inmunizar aves, aunque se necesita el uso de adyuvantes (Schachner et al. 2014).

La vacunación es el método preferido de prevención de la enfermedad, sin embargo, las vacunas actuales no son del todo eficientes. Ha habido un uso extensivo de vacunas inactivadas con formalina de homogenizados de hígado para el control y prevención de la enfermedad. Varias formulaciones han sido usadas en campo, pero ninguna de ellas cumple con el criterio de generar una respuesta inmune rápida y de larga duración contra los brotes naturales de HCI-SHP (Khan et al. 2005). Bajo estas condiciones, el problema radica en la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para generar vacunas más efectivas que cumplan con los requerimientos de protección que demanda la industria.

Las Partículas Similares a Virus (VLP, del inglés: *Virus-Like Particles*) son partículas que se asemejan a virus, pero no contienen ningún material genético viral, por lo que no son infecciosos (Chroboczek et al. 2014; Roy & Noad, 2009). Las proteínas estructurales de la cápside o de la envoltura de muchos virus pueden auto-ensamblarse en estos VLP al ser expresadas en una célula.

Desde el punto de vista inmunológico, los VLP son excelentes inmunógenos (Grgacic & Anderson, 2006; Liu et al., 2012); sin embargo, a la fecha no existen reportes de producción de VLP para adenovirus, probablemente, debido a su enorme complejidad estructural. Para aprovechar las propiedades inmunogénicas de los VLPs en el caso de virus complejos, tal como *Fowl Adenovirus*, es necesario buscar alternativas que permitan su síntesis.

El principal aporte de este trabajo radica en la generación de VLPs con membrana lipídica para un Adenovirus, que no posee membrana, lo cual no ha sido previamente reportado, por lo que este trabajo podrá servir de base para futuras investigaciones en el desarrollo de VLPs relativamente simples a partir de virus complejos, tal como es FAdV. Además, este estudio es el primero en reportar la obtención de VLPs de FAdV y representa un paso importante hacia el desarrollo de vacunas alternativas, más seguras y eficientes, para prevenir la aparición de brotes de FAdV en aves de corral, tanto en el Perú como en otros países.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Fowl Adenovirus* (FAdV)

2.1.1 Importancia de los FAdV: Varios serotipos de FAdV que son agentes causales de la Hepatitis por cuerpos de Inclusión (HCI) y del síndrome de hidropericardio (SHP) han sido reportadas en muchos países del mundo (Hafez, 2011).

La HCI fue descrita por primera vez en USA en 1963 y rápidamente se difundió por muchos países alrededor del mundo (Hafez, 2011; Zadavec et al., 2011) y su importancia en la industria avícola ha ido aumentando en años recientes (Zadavec et al., 2011). Esta enfermedad es usualmente observada en pollos de 3 a 7 semanas de edad. El primer signo es frecuentemente un incremento repentino en la tasa de mortalidad en el grupo de aves, alcanzando algunas veces de 5% a 10%. El patrón de mortalidad, la edad de las aves y los hallazgos histopatológicos *post-mortem* son característicos de la enfermedad y *Fowl Adenovirus* puede ser aislado de las aves afectadas (Philippe et al., 2007). Ha habido un uso extensivo de vacunas inactivadas con formalina de homogenizados de hígado para el control y prevención de la enfermedad. Varias formulaciones han sido usadas en campo, pero ninguna de ellas cumple con el criterio de generar una respuesta inmune rápida y de larga duración contra los brotes naturales de HCI-SHP (Khan et al., 2005).

Por otro lado, el SPH fue reportado por primera vez en Pakistán en 1987, desde entonces ha sido reportado en Irak, Kuwait, India, México, Ecuador, Perú, Chile, Corea, Japón, Eslovaquia y Rusia (Asthana et al., 2013; Mase et al., 2010). El SPH ha sido observado en aves de 3 a 5 semanas de edad, la tasa de mortalidad ha sido reportada un rango entre 20% a 80%. La lesión grave más consistente y predominante es del hidropericardio, que consiste en la acumulación de un fluido claro o de color ambar en el saco pericardial, la que da una apariencia fofa al corazón (Asthana et al., 2013).

En el Perú, el SENASA ha colocado a HCI-SPH dentro de la lista de enfermedades *Notificables*, debido a su importancia para el sistema de vigilancia epidemiológica nacional e internacional (Artículo 9 del Decreto Legislativo N° 1059 “Ley General de Sanidad Agraria”) (SENASA, n.d.).

2.1.2 Clasificación de los FAdV: Los adenovirus son virus icosaédricos, sin envoltura con un genoma de DNA de doble cadena, presentes en la mayoría de vertebrados. La familia Adenoviridae incluye 5 géneros: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* e *Ichtadenovirus*. No hay antigenicidad compartida entre los miembros de estos géneros (Taharaguchi et al., 2012).

FAdV pertenece al género de los *Aviadenovirus* y ha sido agrupado en 5 especies en base a su estructura molecular y dividido en 12 serotipos, por ensayos de neutralización cruzada (Hess, 2000; Steer et al., 2009). En la tabla 1 se muestra la clasificación de *Fowl Adenovirus*, según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (“ICTV Virus Taxonomy 2014,” n.d.).

Tabla 1: Clasificación de *Fowl Adenovirus*, según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV)

Especie	Serotipos
<i>Fowl Adenovirus A</i>	FAdV-1
<i>Fowl Adenovirus B</i>	FAdV-5
<i>Fowl Adenovirus C</i>	FAdV-4
	FAdV-10
<i>Fowl Adenovirus D</i>	FAdV-2
	FAdV-3
	FAdV-9
	FAdV-11
<i>Fowl Adenovirus E</i>	FAdV-6
	FAdV-7
	FAdV-8a
	FAdV-8b

2.1.3 Estructura de los FAdV: En general, la organización de los adenovirus es considerablemente compleja, no solo por su gran tamaño

(~950Å), sino también porque contienen cuatro tipos de proteínas estructurales menores (proteínas IIIa, VI, VIII, IX) en lugares especializados modulando las interacciones del icosaedro cuasi-equivalente (San Martín, 2012). La cápside de los adenovirus está compuesta con 240 copias del Hexon, una proteína homotrimérica que forma las 20 caras del icosaedro, y de 12 Pentones que forman los 12 vértices (El Bakkouri et al., 2008). Para la mayoría de adenovirus humanos y animales el Pentón es un complejo no covalente entre la proteína Pentón Base (pentamérica) y una sola proteína trimérica denominada Fibra. La Fibra es un homotrímero con tres regiones distintas: la cabeza, el tallo y la cola. La Fibra se une al Pentón por su cola N- terminal y al receptor celular por el dominio cabeza en el extremo C-terminal (El Bakkouri et al., 2008). A diferencia de los otros adenovirus, observaciones tempranas de los FAdVs por microscopía electrónica han revelado Pentones con 2 fibras (El Bakkouri et al., 2008; Gelderblom & Maichle-Lauppe, 1982; Hess et al., 1995). Las dos fibras son de diferentes longitudes: la fibra corta (Fibra-2) de ~410 aminoácidos está alrededor de 8.5nm de longitud y se extiende derecho desde la parte superior del Penton Base, mientras que la fibra larga (Fibra-1), de ~710 aminoácidos y 42.5nm de longitud, se extiende en 90° desde la base Pentón (Hess et al., 1995). En resumen, el ensamblaje de la cápside de los FAdV requiere de al menos cuatro proteínas estructurales mayores (Hexón, Pentón, Fibra-1 y Fibra-2) y cuatro proteínas estructurales menores que estabilizan la cápside (proteínas IIIa, VI, VIII, IX), que lo hacen un virus estructuralmente complejo.

2.1.4 Función de la Fibra-2 y su rol en la patogenicidad de FAdV: La función tanto de la Fibra-1 (Fibra larga) como la de la Fibra-2 (Fibra corta) de FAdV ha sido estudiada por Tan *et al.* (2001), a través de la generación de FAdVs modificados a los cuales se les eliminó la Fibra-1 y en otro caso la Fibra-2, determinando que la presencia de la Fibra-2 es esencial para el crecimiento, ensamblaje y propagación del virus (Tan *et al.* 2001). La Fibra-2 ha sido altamente relacionada a la virulencia del

virus, en trabajos como de Pallister *et al.* que reportaron que variaciones en un solo gen que codifica la Fibra-2 fue responsable de variaciones en la virulencia de FAdV-8 (Pallister *et al.*, 1996), mientras que Mase *et al.* asociaron las secuencias de la Fibra-2 del serotipo 4 con su patogenicidad, obteniendo mediante análisis filogenético una clara separación entre las cepas que causaban el Síndrome de Hidropericardio y las que no, lo que sugiere que la Fibra-2 juega un rol importante en la patogenicidad de FAdV (Mase *et al.*, 2010).

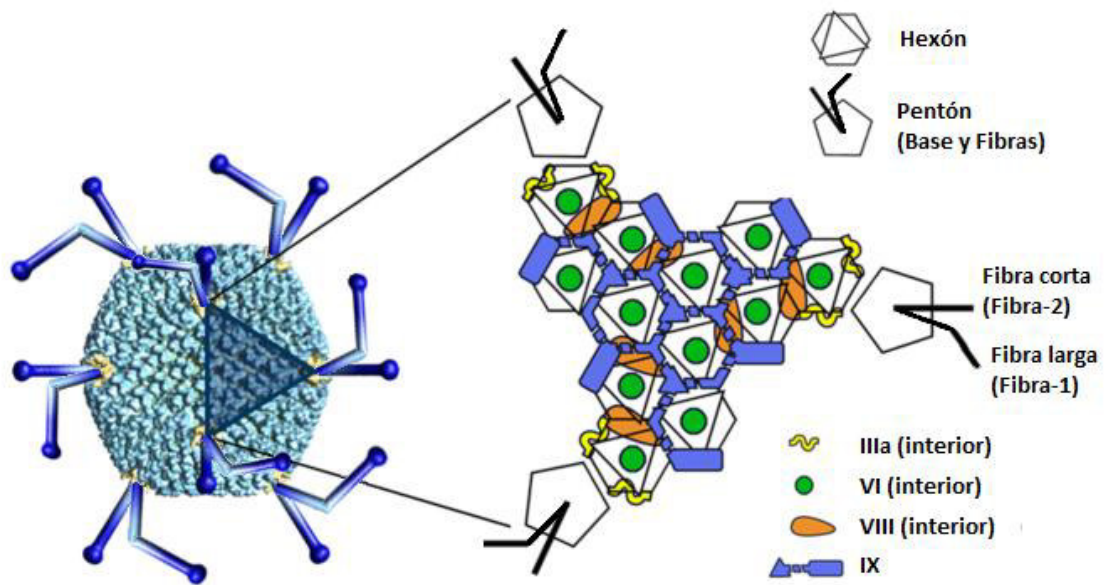


Fig 1. Estructura de la cápside de Fowl Adenovirus serotipo-4 (FAdV-4). Estructura icosaédrica de la cápside según el conocimiento estructural actual. A la izquierda se presenta un modelo modificado a partir de un mapa de Criomicroscopía electrónica, donde los Pentones se muestran en amarillo y las fibras (corta y larga) se muestran en azul oscuro. El triángulo sombreado representa una cara de la cápside. A la derecha se muestra un esquema de una de las caras, donde se puede observar que la presencia de las 4 proteínas estructurales mayores (Hexón, Pentón, Fibra-1 y Fibra-2) y las 4 menores (IIIa, VI, VIII y IX). Figura modificada de San Martín, 2012.

Además, recientemente se ha demostrado que la Fibra-2 es capaz de conferir protección contra FAdV-4 (Schachner *et al.*, 2014). Para ese experimento, los autores usaron el sistema de expresión eucariota basado en baculovirus para expresar en células de insecto las proteínas Fibra-1, Fibra-2 y la porción del Loop-1 del Hexón (Hex-L1) de FAdV-4. Luego, vacunaron 4 grupos de pollos, donde a cada ave de cada grupo se le vacunó con 50 µg de su correspondiente proteína junto con un adyuvante oleoso, mientras que el quinto grupo fue un control sin proteína recombinante inoculada. Finalmente, luego del desafío, se

observó que el grupo de aves vacunadas con la proteína Fibra-2 presentó una protección mayor al 95% (% de supervivientes) ante un desafío letal con una cepa virulenta de FAdV-4, mientras que la Fibra-1, el Hex-L1 y el control no vacunado tuvieron tasas de mortalidad de 38%, 73% y 78%, respectivamente (Schachner et al., 2014). Esto demuestra la importancia de la Fibra-2 en la protección contra FAdV-4.

2.1.5 Vacunas convencionales y experimentales:

Las vacunas convencionales contra HCl-SPH son formuladas con homogenizados de hígado y son ampliamente utilizadas en algunos países para el control y prevención de la enfermedad (Khan et al., 2005). Varias de estas vacunas no son siempre exitosas porque carecen de la cantidad apropiada de virus, el adyuvante correcto, son preparadas en pobres condiciones de higiene e inapropiada inactivación del virus que puede causar la aparición de brotes en lugar de evitarlos (Ahmad et al., 2009; Khan et al., 2005). Debido a esto varios investigadores han desarrollado experimentalmente algunos candidatos a vacunas interesantes. Entre ellas, están las vacunas basadas en la producción de subunidades de las principales proteínas inmunogénicas del virus. En un estudio realizado por Shah et al. (2012) se propone el uso de la proteína Pentón producida en *E. coli* como candidato para combatir a FAdV serotipo-4 (FAdV-4), llegando a un 90% de protección, aunque empleando el adyuvante completo de Freund, el cual no es recomendado por la FDA (Shah et al., 2012). En otro trabajo más reciente, realizado por el grupo de Hess en Austria se probaron 3 proteínas producidas con el sistema de expresión de Baculovirus como posibles candidatos a vacuna: la Fibra-1, la Fibra-2 y el Hexón, obteniéndose que la Fibra-2 claramente confiere la mayor protección frente a un desafío letal (Schachner et al., 2014). Por otro lado, también en Austria han intentado desarrollar una vacuna viva de FAdV-4 atenuada por pasajes sucesivos en células QT35, donde se reportó que este virus atenuado confería protección en ausencia de anticuerpos neutralizantes (Schonewille et al., 2010), sin embargo con este tipo de

vacunas existe el problema de una posible reversión a virulencia y además existe la posibilidad de que las mutaciones que atenúan al virus causen algunas diferencias antigénicas que causen que la protección no sea adecuada bajo condiciones de campo.

2.2 Partículas Similares a Virus (VLP)

Las vacunas son la manera más efectiva de prevenir enfermedades inducidas por agentes infecciosos. El uso de vacunas ha erradicado exitosamente la viruela y ha reducido la incidencia de sarampión, paperas, rubeola y poliomielitis. Muchas de estas exitosas vacunas virales están basadas en virus vivos-atenuados o inactivados. Sin embargo, algunas enfermedades infecciosas tales como malaria, tuberculosis, VIH, dengue y otras han sido un mayor reto para los fabricantes de vacunas (Singh & Srivastava, 2011).

Los virus tienen la característica única de autoensamblarse en partículas dentro del hospedero. Los avances de la biología molecular en los últimos 30 años han permitido a los investigadores diseñar nuevas vacunas virales usando la genética recombinante, tal como es el caso de los VLPs, también conocidos como “virosomas” o “pseudoviriones” (Singh & Srivastava, 2011).

Los VLPs consisten en una o más proteínas estructurales sin incluir el genoma del virus nativo, semejando al virión auténtico pero sin tener la capacidad de auto-replicación en células, rindiendo potencialmente candidatos a vacunas más seguras sin la necesidad de usar adyuvante (Liu et al., 2012). Los VLPs han sido producidos a partir de los componentes de la cápside o de la envoltura de una amplia variedad de virus con el propósito de estudiar el ensamblaje viral y para el desarrollo de vacunas (Grgacic & Anderson, 2006). Algunos VLPs han sido empleados en la producción de vacunas humanas, tales como las vacunas licenciadas contra el virus de la hepatitis B y del Papiloma virus humano (HPV), sin embargo, aún no hay reportes de vacunas veterinarias licenciadas de VLPs en el mundo (Liu et al., 2012).

2.2.1 Tipos de VLPs:

2.2.1.1 VLPs de virus estructuralmente simples: Un grupo de cápsides virales sin envoltura están formadas por solo una o dos proteínas y así son relativamente fáciles de manipular para la generación de VLPs a través de sistemas de expresión heterólogos. Ejemplos de ello son los VLPs formados por la expresión de una proteína mayor de la cápside de Papilomavirus, Parvovirus, Calcivirus, Circovirus, Poliomavirus y virus de la Hepatitis E (Roy & Noad, 2009). El ejemplo más representativo de este tipo de VLPs es el HPV, el cual es generado a partir de la expresión de la proteína L1, que de alguna manera forman partículas virales “vacías” estructuralmente similares a las formadas durante la replicación del Papilomavirus (Grgacic & Anderson, 2006).

2.2.1.2 VLPs con múltiples capas de proteínas: Las partículas virales que consisten de cápsides con múltiples capas de proteínas presentan mayores desafíos técnicos para el ensamblado y liberación de VLPs, que aquellas formadas por una sola proteína mayor, ya que las proteínas de la capsida viral deben ser co-expresadas en la misma célula para generar VLPs (Liu et al., 2012). Ensamblajes complejos de VLPs formados por multiproteínas han sido eficientemente producidos para miembros de la familia Reoviridae. El primer miembro de esta familia para el cual se describieron VLPs fue el Virus de la enfermedad de Lengua Azul (BTV), el cual posee una estructura multicapa icosaédrica, organizada en dos cápsides compuesta por 4 proteínas (VP2, VP5, VP3 y VP7). La expresión de las mayores cuatro proteínas estructurales de este virus ha sido obtenida a través de la construcción de un baculovirus que expresa simultáneamente las 4 proteínas (Roy & Noad, 2009).

2.2.1.3 VLPs de virus con envolturas lipídicas: muchos patógenos virales tales como influenza, VIH y hepatitis C están rodeados de una envoltura, una membrana que consiste de una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera, donde se insertan las glicoproteínas

espículas del virus. Estas proteínas son *targets* de anticuerpos neutralizantes y son componentes esenciales de la vacuna (Roy & Noad, 2009). Para estos virus, la elección del sistema de expresión puede ser importante para la eficiencia de formación del VLP (Liu et al., 2012). El ejemplo más resaltante de VLP de virus con envoltura lipídica es el caso de la Influenza humana, de la cual se hacen VLP basados en la co-expresión de proteínas estructurales de influenza en células de mamíferos, insectos o plantas, los cuales han mostrado en fase clínica ser vacunas seguras y eficaces contra pandemias de Influenza (Krammer & Palese, 2015). Las VLPs con envolturas formadas con las proteínas estructurales del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), un paramyxovirus aviar, son candidatos potenciales a vacunas en la industria avícola (Morrison, 2010). Más importante, estos VLPs son una novedosa y versátil plataforma para la construcción de vacunas efectivas para muchos patógenos virales de humanos y de animales, incluyendo virus genéticamente complejos y virus para los cuales actualmente no existen vacunas (Morrison, 2010). Los VLPs de NDV serán tratados más adelante con mayor detalle.

2.2.2 Propiedades Inmunogénicas de los VLPs: En muchos casos los VLPs tienen características estructurales y de inmunogenicidad similares a la del virus parental, y algunos han sido ya aprobados como vacunas exitosas contra la infección del virus correspondiente (por ejemplo: el virus de la Hepatitis B y el papiloma virus humano). Los componentes estructurales de algunos VLPs han probado ser fácilmente sometidos a la inserción o fusión de secuencias antigénicas, permitiendo la producción de VLPs quiméricos exponiendo antígenos foráneos en su superficie (Grgacic & Anderson, 2006). Los VLP incorporan características inmunológicas claves de los virus, las cuales incluyen superficies repetitivas, estructuras particuladas y la inducción de la respuesta inmune innata a través de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (Jennings & Bachmann, 2008). Los VLPs son usualmente más inmunogénicos que las subunidades o proteínas

recombinantes inmunógenas y son capaces de estimular ambas ramas del sistema inmune, la respuesta humoral y la respuesta celular (Grgacic & Anderson, 2006).

2.2.2.1 VLPs y la inducción de la Respuesta Humoral: los VLPs proveen la estructura espacial para presentar epítopes conformacionales y al hacerlo están probablemente imitando la estructura del virus nativo, de este modo potencian la producción de anticuerpos neutralizantes. Esto puede ser especialmente cierto para proteínas de superficie de parásitos y virus con envoltura, donde los VLPs con envoltura permiten que las proteínas vacunales sean presentadas en su estado natural, como proteínas ancladas a la membrana, en lugar de ectodominios solubles. Los VLPs pueden por tanto ofrecer un enfoque seguro y efectivo para la inducción de anticuerpos, donde las formas solubles de las proteínas fallan en ser efectivas (Grgacic & Anderson, 2006). A nivel molecular, los epítopes repetitivos en la superficie viral entrecruzan inmunoglobulinas (Igs) específicas que comprenden el receptor de células B (BCR, del inglés: *B-cell receptor*) en la superficie de los linfocitos B (Jennings & Bachmann, 2008). El espacio óptimo de antígenos para la activación de células B ha sido determinado usando moléculas de polímeros con haptenos. Se encontró que un mínimo de 20-25 epítopes espaciados por 5-10 nm fueron suficientes para la activación óptima de células B (Dintzis et al., 1982; Jennings & Bachmann, 2008). Los epítopes inmunogénicos expuestos en los virus y VLPs tienen números y distancias similares (Jennings & Bachmann, 2008).

2.2.2.2 VLPs, células Dendríticas y la Respuesta Celular inmune Innata y Adaptativa: En algunos casos los VLPs parecen no necesitar el uso de adyuvantes para estimular una potente respuesta inmune (Grgacic & Anderson, 2006). Los efectos auto-adyuvantes de tales VLPs son inherentes debido a su tendencia a poseer un tamaño favorable para la absorción por las células dendríticas vía macropinocitosis y endocitosis que juegan un papel central en la activación de las respuestas innata y adaptativa (Ludwig & Wagner,

2007), procesando y presentando antígenos vía los MHC clase II y promoviendo la maduración y migración de DC. Las DCs circulantes en la periferia toman activamente el antígeno y lo transfieren a los nódulos linfáticos para su subsecuente presentación a las células T. La presentación de antígeno por las células dendríticas, que expresan moléculas co-estimuladoras y citoquinas, es necesaria para generar una respuesta fuerte y efectiva de células T con memoria duradera (Jennings & Bachmann, 2008). Los VLPs exógenos pueden también ser absorbidos y procesados vía MHC clase I (presentación cruzada) para la activación de las células T CD8+, las cuales son esenciales para la eliminación de patógenos intracelulares como los virus (Grgacic & Anderson, 2006).

2.2.3 NDV como plataforma para generar VLPs

2.2.3.1 Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV): Este virus es capaz de infectar a todas las especies de aves, y cepas virulentas pueden causar síntomas clínicos significativos. Debido al gran rango de especies que pueden ser infectadas, el virus se ha establecido en todo el mundo. Esta enfermedad tiene efectos devastadores en aves de crianza a nivel industrial debido a la alta morbilidad y mortalidad asociada a cepas virulentas. Los síntomas clínicos de la enfermedad de Newcastle (ND, del inglés: *Newcastle Disease*) incluyen baja en la producción de huevos, aflicción respiratoria, languidez, debilidad y síntomas del sistema nervioso central (Hines & Miller, 2012). El NDV pertenece a la familia de los Paramyxovirus, que se caracterizan por ser virus que poseen envoltura y un genoma RNA negativo de cadena simple. El NDV tiene un genoma organizado en 6 genes en la siguiente disposición 3'-N-P-M-F-HN-L-5' (Gogoi et al., 2015). Todos los viriones de los paramyxovirus contienen al menos dos glicoproteínas: una de anclaje, llamada proteína Hemaglutinina-Neuroaminidasa (HN), en el caso del virus de Newcastle; y la proteína de Fusión (F), la cual media la fusión de las membranas virales. Revistiendo la superficie interior de la membrana esta la Matriz o proteína de membrana (M). El centro del virus contiene el RNA

genómico y tres proteínas asociadas: la Nucleoproteína (N), la cual se une al RNA genómico; la fosfoproteína (P); y la polimerasa viral, la proteína larga (L) (Morrison, 2010). En la figura 2 se muestra la estructura y genoma de NDV.

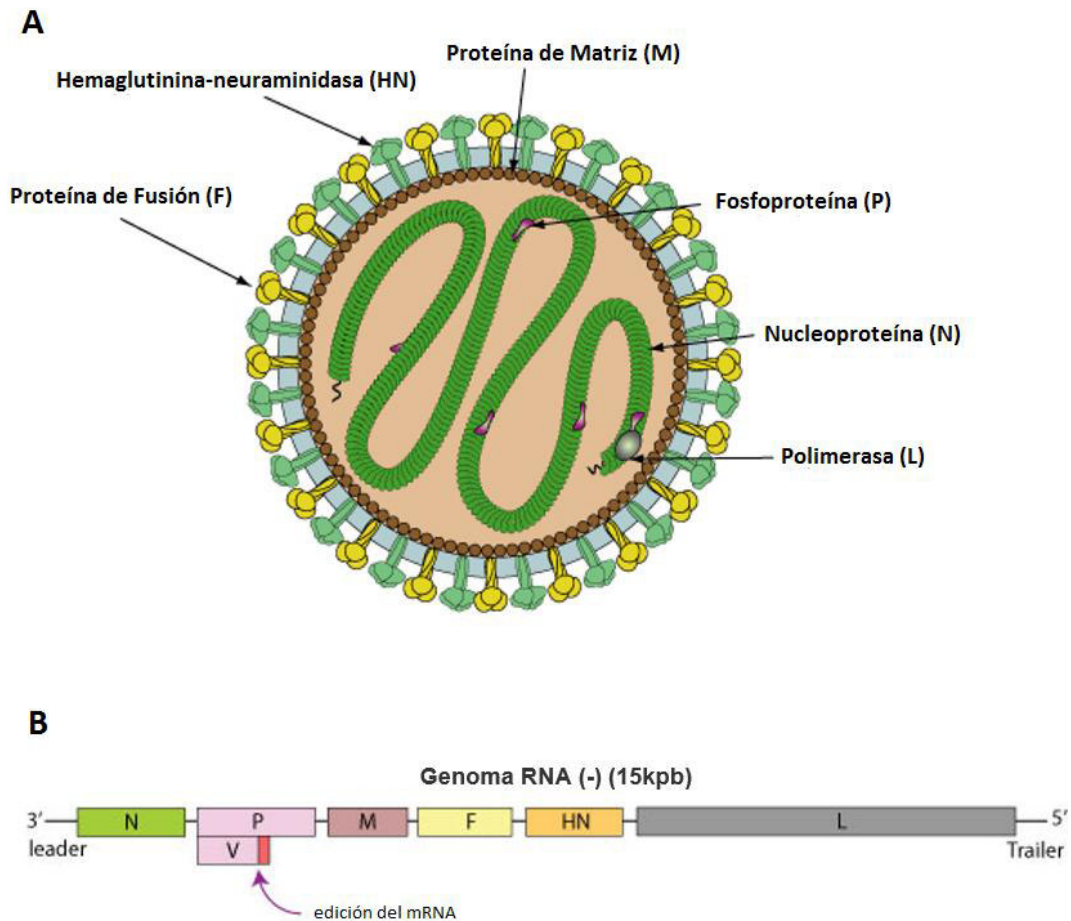


Fig 2. Esquema de la estructura y genoma de NDV. (A) Estructura de los viriones ensamblados. (B) Genoma de NDV. La figura fue modificada de ViralZone ("ViralZone: Avulavirus," n.d.) http://viralzone.expasy.org/all_by_species/84.html

2.2.3.2 Generación de VLP a partir de NDV: Para muchos paramyxovirus, la expresión de la proteína M en ausencia de otras proteínas virales es suficiente para la formación de VLPs, a partir de células transfectadas (Harrison et al., 2010). En el caso del NDV, se ha demostrado que la expresión de la proteína M es requisito indispensable y suficiente para la producción de VLPs (Pantua et al., 2006). Sin embargo, la presencia de al menos 3 proteínas estructurales es necesaria para una liberación eficiente de VLP al medio extracelular, es decir se requiere la presencia de la proteína M

junto con otras 2 proteínas entre las N, F ó HN (Pantua et al., 2006). En el caso de las glicoproteínas de superficie F y HN, se ha demostrado que solo es necesario el dominio citoplasmático para la liberación eficiente de VLP, lo que permite que los ectodominos de estas proteínas puedan ser reemplazados sin impactar en el ensamblaje de estos VLP (McGinnes et al., 2011). Los VLPs derivados de NDV tienen un potencial de aplicación significativo más allá de las vacunas para el virus de Newcastle. Los VLPs derivados de NDV son una nueva y versátil plataforma para la construcción de efectivos candidatos a vacunas para muchos patógenos humanos o veterinarios, incluyendo virus genéticamente complejos (Morrison, 2010). De hecho, se ha demostrado que el ensamblaje de VLP no es afectado por la fusión de una secuencia foránea a la región N-terminal a la proteína HN, alcanzando la posibilidad de usar estos VLPs para presentar dominios que puedan estimular anticuerpos neutralizantes o respuesta de células T (Morrison, 2010).

Algunos investigadores han desarrollado VLPs derivados de Newcastle con el objetivo de presentar proteínas antigénicas de otros virus, un ejemplo de esto es el Virus Sincitial Respiratorio Humano (RSV, del inglés: Human respiratory syncytial virus), donde se produjeron VLPs que contenían la proteína G del RSV, los cuales tras la inmunización en ratones demostraron generar niveles de anticuerpos similares a los producidos por virus vivo o virus inactivados por radiación ultravioleta (UV) (Gu et al., 2015; Murawski et al., 2010). A la fecha, las publicaciones relacionadas se han basado en la expresión de VLPs que contengan proteínas inmunogénicas de otros virus con envoltura, donde se reemplaza el ectodominio de las glicoproteínas HN ó F de NDV por el ectodominio de una proteína de interés de otro virus, sin embargo, la presente investigación será la primero en generar un VLP derivado de NDV para una proteína completa de un virus que no posee envoltura como un Adenovirus.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La co-expresión de las proteínas M y N de NDV junto con la proteína quimérica hnFib2 genera Partículas Similares a Virus (VLPs) que contienen la proteína Fibra 2 de *Fowl Adenovirus*

3.2 Objetivo General

Diseñar y construir VLPs con envoltura cuya superficie contenga la proteína Fibra 2 de *Fowl Adenovirus* serotipo 4 (FAdV-4)

3.3 Objetivos Específicos

- Diseñar, sintetizar químicamente y expresar un gen que codifique la proteína quimérica hnFib2, compuesta de la región citoplasmática y transmembrana de la proteína Hemaglutinina-Neuroaminidasa (HN) de NDV fusionada a la proteína Fibra-2 de FAdV-4.
- Construir vectores plasmídicos que expresen la Proteína Verde Fluorescente mejorada (EGFP), proteína Matriz (M) del virus de Newcastle (NDV), la Nucleoproteína (N) de NDV y la proteína quimérica hnFib2.
- Optimizar el proceso de transfección en células DF-1, utilizando un vector que exprese la EGFP, como proteína reportera.
- Purificar el VLP expresado.
- Determinar la presencia de las proteínas que componen el VLP purificado a través de Western Blot.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material Biológico:

Línea celular DF-1: Es una línea celular de origen aviar, inmortalizada espontáneamente de fibroblastos de pollo obtenidos de huevos de 10 días de edad de la línea East Lansing (ELL-0) (ATCC Cat. CRL-12203). Las células fueron mantenidas en DMEM, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%.

Cepa de *Escherichia coli* DH5α: Para todos los clonamientos se ha utilizado la cepa DH5α, químicamente competentes, de Invitrogen™. Esta cepa tiene mutaciones que impiden la recombinación, lo que asegura la estabilidad de los plásmidos. Todos los cultivos de *E. coli* fueron realizados a 37°C.

Medios y soluciones de cultivo: los diferentes medios y soluciones de cultivo usados durante el desarrollo de este trabajo así como su formulación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Medios y soluciones de cultivo

4.2 M

Tipo	Formulación (1L)	Uso
DMEM 5%-SFB	950 mL de Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) de la casa comercial Hyclone; 50 mL Suero Fetal Bovino (SFB)	Cultivo de DF-1
RBS 1X	8g NaCl; 0.2g KCl; 115g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 0.2g KH ₂ PO ₄ ; y ajustado a 1L (pH 7.3) con agua ultrapura y autoclavado.	Lavado de células DF-1
OPTIMEM I	Medio comercial con bases de DMEM enriquecido y sin SFB	Transfección de DF-1
Tripsina-EDTA	Proteasas derivadas de páncreas porcino, con EDTA al 0.25% de la casa comercial Gibco®	Disgregación celular de DF-1
SOC	Extracto de Levadura 0,5%; Bactotripton 2%; NaCl 10mM; KCl 2.5mM; MgCl ₂ 10mM; MgSO ₄ 10mM; glucosa 20mM	Transformación <i>E.coli</i>
LB	Luria-Bertani: Extracto de levadura 0.5%; Bactotripton 1%; NaCl 1%	Cultivo de <i>E.coli</i> en suspensión
LB-Agar	Extracto de levadura 0.5%; Bactotripton 1%; NaCl 1%; agar 1.5%	Cultivo de <i>E.coli</i> en placa

al, la metodología que siguió esta investigación es la siguiente: Primero, se obtuvieron los plásmidos: pcDNA3.1-EGFP, pCI-N, pVAX1-M y pVAX1-hnFib2. El plásmido pcDNA3.1-EGFP codifica la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP, del inglés: Enhanced Green Fluorescent Protein), la cual fue utilizada como gen reportero para encontrar las condiciones óptimas de transfección. Los plásmidos pCI-N y pVAX1-M codifican las proteínas N y M de NDV. El plásmido pVAX1-hnFib2 codifica la proteína hnFib2, que está compuesta por la proteína Fibra 2 de FAdV-4 fusionada en el extremo N-terminal a los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína HN de NDV. Luego se procedió a transfectar a gran escala los plásmidos pCI-N, pVAX1-M y pVAX1-hnFib2 en células DF-1 de manera que se expresaron las 3 proteínas (M, N y hnFib2) simultáneamente. Para demostrar que las proteínas expresadas fueron capaces de ensamblar VLPs, se procedió a purificar los viriones por ultracentrifugación a partir del sobrenadante de las células transfectadas. Finalmente, el análisis de la presencia de estas proteínas en los viriones purificados fue realizado por western blot.

4.2.1 Construcción de vectores plasmídicos

4.2.1.1 Diseño del gen quimérico hnFib2: Se diseñó el gen hnFib2 que codifica una proteína Fibra-2 modificada, capaz de incorporarse en los VLPs de NDV. El gen hnFib2 codifica la proteína del mismo nombre, que está compuesta en su extremo N-terminal por los dominios citoplasmático (DC) y transmembrana (DT) de la proteína HN de NDV, y en su extremo C-terminal del marco de lectura (ORF, del inglés: *Open Reading frame*) completo de la Fibra-2. La secuencia nucleotídica que codifica la proteína HN corresponde a la cepa LaSota de NDV (Genbank N° JF950510.1) y la secuencia de la Fibra-2 se tomó de una secuencia de un FAdV-4 aislado previamente en Perú por FARVET S.A.C. (datos no publicados). Para construir el gen hnFib2 fue necesario determinar cuál es la región que corresponde a los DC y DT de la proteína HN, lo cual fue realizado utilizando el predictor en línea **TMHMM Server v. 2.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001). Se

predijo que los primeros 22 aminoácidos (aa), desde la región N-terminal de la proteína HN, corresponden al DC, los siguientes 23 aa corresponden al DT y los otros 533 aa corresponden al ectodominio (ver figura 3). Entonces, para el diseño del gen hnFib2 se tomaron los primeros 141 pares de bases (pb) del gen HN (correspondiente a los primeros 47 aa) y a su extremo 3' se fusionó el ORF completo de la Fibra-2 de FAdV-4 (1440 pb), obteniéndose el gen quimérico hnFib2 de 1581pb y que codifica una proteína de 527 aa (ver figura 4). Este gen fue sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ).

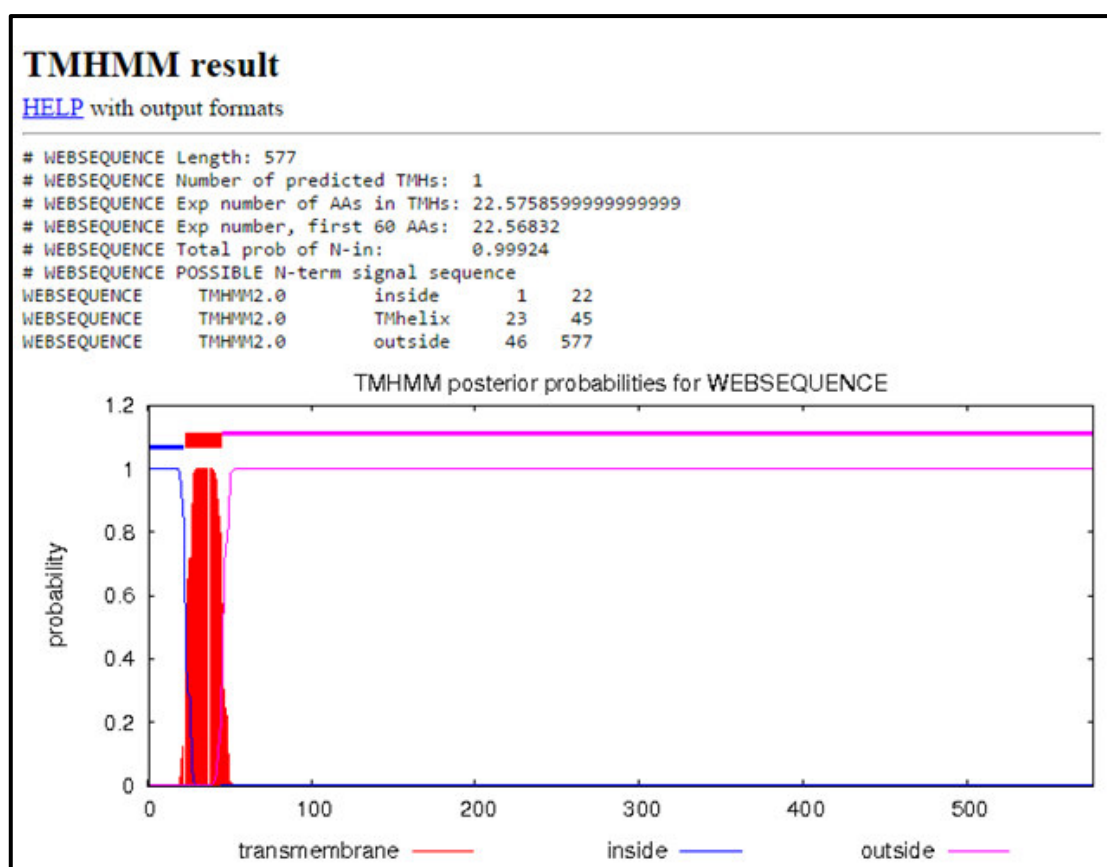


Fig 3. Predicción del dominio transmembrana de la proteína HN. Fue realizada en el servidor en línea TMHMM Server v. 2.0, utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína HN de la cepa LaSota de NDV.

4.2.1.2 Clonamiento de vectores plasmídicos: pcDNA3.1-EGFP, pCI-N, pVAX1-M y pVAX1-hnFib2: Los plásmidos comerciales pcDNA3.1, pCI y pVAX se caracterizan por ser plásmidos de expresión para células de mamíferos, sin embargo también tienen la capacidad de expresar eficientemente genes en células de aves.

Todos estos plásmidos tienen en común el uso del promotor del Citomegalovirus humano (CMV) el cual expresa los genes de interés en altos niveles en células y tejidos de pollos (Oshop et al., 2003). La estrategia que se siguió en este trabajo consistió en la amplificación de los fragmentos de DNA a partir de otros plásmidos o muestras biológicas, que contenían las secuencias de interés, provistas por el Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica de FARVET SAC.

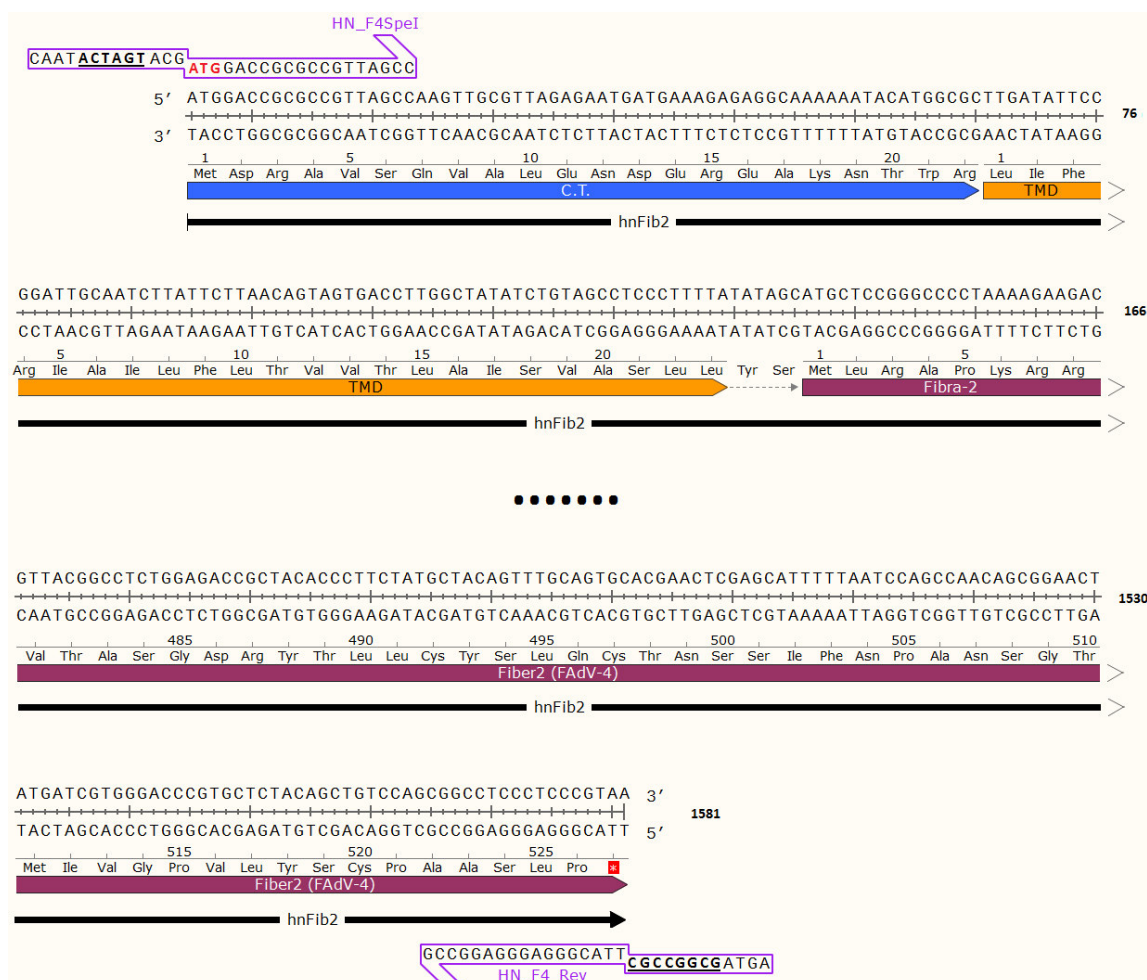


Fig 4. Secuencia nucleotídica del gen hnFib2. Se muestran los primeros 166pb de la región 5' y los últimos 141pb de la región 3' de la secuencia nucleotídica del gen hnFib2 y su traducción a aminoácidos. La barra azul indica la secuencia correspondiente al dominio citoplasmático, la barra amarilla es el dominio transmembrana de la proteína HN y la barra morada el ORF de la Fibra-2 de FAdV-4. Los oligonucleótidos (HN_F4SpeI y HN_F4_Rev) utilizados para clonar este gen se muestran alineados en sus regiones complementarias, donde el sitio de reconocimiento para las endonucleasas de restricción está en negrita y subrayado.

Para la obtención del plásmido pcDNA3.1-EGFP se amplificó el ORF completo, que codifica la EGFP, utilizando la polimerasa de alta fidelidad Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo

Scientific), con los oligonucleótidos FegfpHind y RegfpBam que tenían en sus extremos 5' las secuencias de los sitios de restricción HindIII y BamHI, respectivamente (ver tabla 3). Luego se clonaron en el vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) entre los sitios HindIII y BamHI (ver esquema de clonamiento en la figura 5A).

Para la obtención de los plásmidos pCI-N y pVAX1-M, primero se extrajo el RNA de NDV con el QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), a partir de fluido alantoideo de huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) que habían sido infectados con la cepa LaSota de NDV. Luego, se realizó un RT-PCR para amplificar el ORF completo de la Nucleoproteína (N), utilizando los oligonucleótidos: NP For primer y NP Rev primer (ver Tabla 3); y otro RT-PCR para amplificar el ORF completo de la proteína Matriz (M), utilizando los oligonucleótidos: forMnhe y revMnot (ver Tabla 3). El ORF de la proteína N fue insertado en el plásmido pCI (Promega®) entre los sitios EcoRI y *NotI*, generando el plásmido pCI-N (ver esquema de clonamiento en la figura 5B). Para obtener el plásmido pVAX1-M, el ORF amplificado de la proteína M fue insertado en el plásmido pVAX1 (Invitrogen®) entre los sitios *NheI* y *NotI* (ver esquema de clonamiento en la figura 5C).

Finalmente, para obtener el plásmido pVAX1-hnFib2, el gen que codifica la proteína quimérica hnFib2 fue químicamente sintetizado por la empresa GenScript (Piscataway, NJ). El gen hnFib2 fue amplificado con los oligonucleótidos HN_F4SpeI y HN_F4_Rev (ver tabla 3), que estaban flanqueados en sus extremos 5' con los sitios de restricción SpeI y *NotI*, respectivamente. Luego se clonó hnFib2 en el vector pVAX1 (Invitrogen) entre *NheI* y *NotI*, generando el plásmido pVAX1-hnFib2 (ver esquema de clonamiento en la figura 5D). El sitio *NheI* del vector pVAX1 fue destruido debido a que SpeI (en el inserto) y *NheI* (en el vector) tienen extremos cohesivos compatibles, pero la ligación no genera ninguno de los sitios de restricción. Todos los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 3 y los mapas de los plásmidos se encuentran en la figura 5.

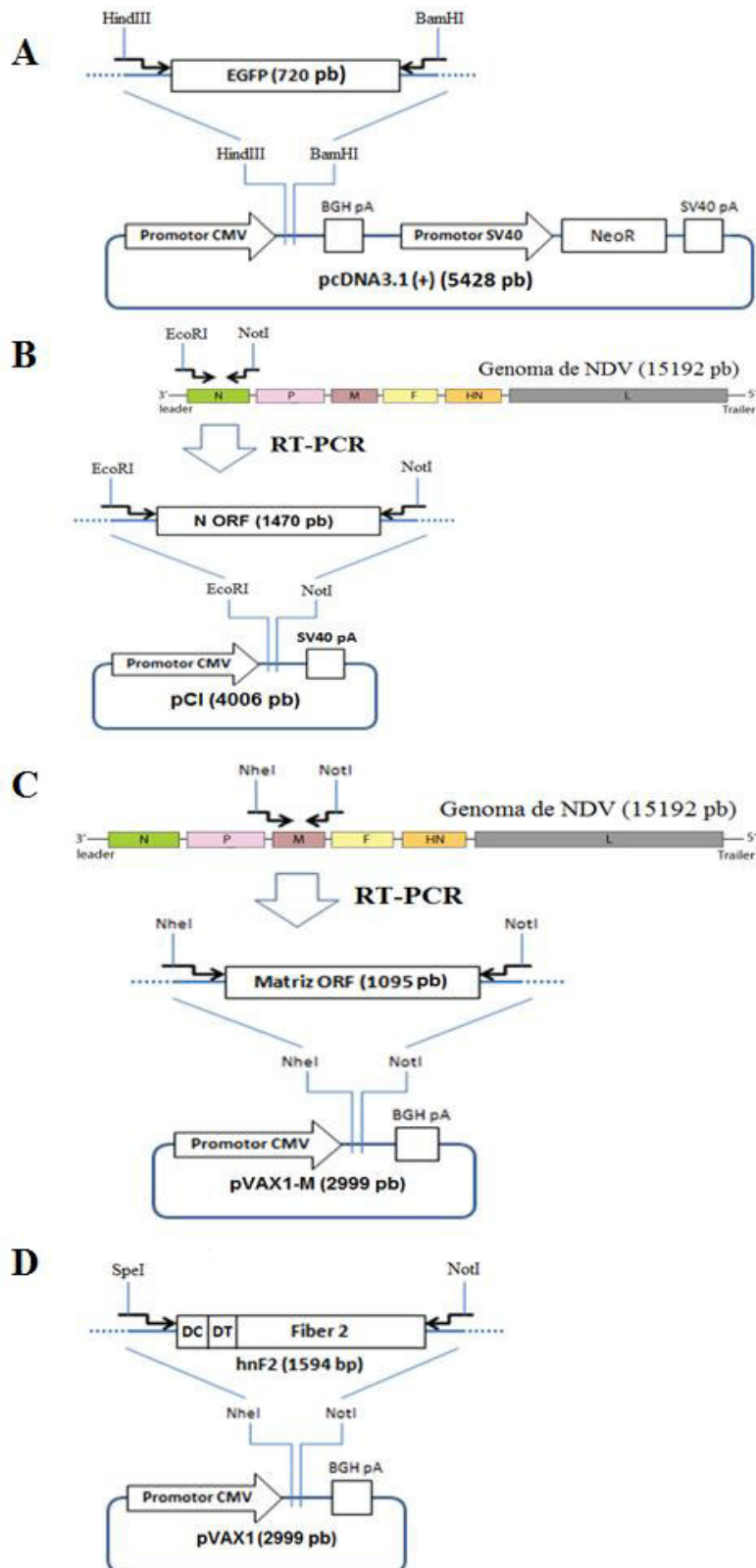


Fig 5. Esquema de clonamiento de los vectores plasmídicos. (A) Plásmido pcDNA3.1-EGFP. La EGFP fue insertada en el plásmido pcDNA3.1(+) (Invitrogen) entre los sitios HindIII y BamHI. (B) Plásmido pCI-N. La proteína N fue amplificada a partir del RNA genómico de NDV y luego insertada en el plásmido pCI (Promega) entre los sitios EcoRI y NotI. (C) Plásmido pVAX1-M. La proteína M fue amplificada a partir del RNA genómico de NDV y luego fue insertada en el plásmido pVAX1 (Invitrogen) entre los sitios NheI y NotI. (D) Plásmido pVAX1-hnFib2. La proteína quimérica hnFib2 fue insertada en el plásmido pVAX1 (Invitrogen) entre los sitios NheI y NotI.

Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados para el proceso de clonación. Para cada uno se indica el sitio de reconocimiento para las endonucleasas de restricción (en negrita y subrayado). Las secuencias en rojo corresponden al codón de inicio de la proteína.

Nombre	Secuencia 5'->3'	Sitio de restricción
FegfpHind	AAT <u>AAGCTT</u> ACC ATG GTGAGCAAGGGCGAGGAG	HindIII
RegfpBam	AAT <u>GGATCC</u> TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	BamHI
NP For primer	<u>GGAATTC</u> GCCACC ATG TCTTCCGTATTTGATG	EcoRI
NP Rev primer	<u>GCGGCCGC</u> TCAATACCCCCAGTCGGTGT	<i>NotI</i>
HN_F4SpeI	CAAT <u>ACTAGT</u> ACG ATG GACCGCGCCGTTAGCC	SpeI
HN_F4_Rev	AGTAG <u>GCGGCCGC</u> TTACGGGAGGGAGGCCG	<i>NotI</i>
forMnhe	CAAT <u>GCTAGC</u> ACC ATG GACTCATCTAGGACAATTGGGC	<i>NheI</i>
revMnot	GAG <u>GCGGCCGC</u> CTTATTTCTTAAAGGATTGTATTTGGC	<i>NotI</i>

Todos los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando SYBR[®] Safe (Thermo Scientific) para visualizar el DNA. Luego los fragmentos de interés fueron cortados del gel y purificados con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Estos fragmentos y los vectores plasmídicos fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes y nuevamente fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa y purificados. Subsecuentemente, los fragmentos purificados fueron ligados con el Quick Ligation[™] Kit (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que la transformación se llevó a cabo en células DH5 α químicamente competentes (Invitrogen) mediante shock térmico y sembrando las células transformadas en placas de LB-Agar suplementadas con 50 μ g/mL de Kanamicina (para pVAX1) o con 100 μ g/mL de Ampicilina (para pCI y pcDNA3.1). Al menos 2 colonias de cada plásmido fueron sembradas en caldos LB suplementados con kanamicina o ampicilina según corresponde y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Luego se extrajeron los plásmidos con el QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La comprobación del correcto

ensamblaje de los plásmidos se realizó por digestión con enzimas de restricción y luego por secuenciación.

4.2.1.3 Secuenciación: Para confirmar que los plásmidos no tienen mutaciones indeseables, se secuenciaron los plásmidos por pirosecuenciación con el GS Junior System (Roche). La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación de DNA basada en la detección en tiempo real de Pirofosfato (PPi) durante la síntesis de DNA. La síntesis de DNA se da por la polimerización de nucleótidos hecha por una DNA polimerasa, donde la reacción de adición de cada nucleótido añadido libera un PPi inorgánico. Una sulfurilasa convierte este PPi liberado en ATP, que proporciona la energía para que la luciferasa pueda oxidar la luciferina en oxiluciferina, generando luz. Debido a que el nucleótido añadido es conocido, la secuencia de la plantilla se puede determinar en cada pocillo de la placa (Harrington et al., 2013; Petrosino et al., 2009). En la figura 6 se muestra un esquema de las reacciones que se dan en la pirosecuenciación.

Esta técnica tiene tres etapas: **Preparación de la librería**, donde se fragmenta selecciona, amplifica y ligan los adaptadores a cada fragmento de DNA; **emPCR** (PCR en emulsión), la cual consiste en inmovilizar una única molécula de ssDNA de la librería en una perla en una emulsión agua en aceite que contiene todos los reactivos de amplificación para finalmente tener una *bead* conteniendo miles de copias clonales de un fragmento (esto se da en paralelo para miles de fragmentos); y la **secuenciación**, la cual consiste en la síntesis de la cadena complementaria y la detección de los nucleótidos incorporados.

Para secuenciar todos los plásmidos en una sola placa, a cada muestra se le incorporó un adaptador diferente, llamado Identificador múltiplex (MID, del inglés: *Multiplex identifier*). Estos adaptadores tienen secuencias diferentes que luego al hacer el análisis post-secuenciación permiten discriminar entre la librería de un plásmido y

otra. Todos los protocolos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche)

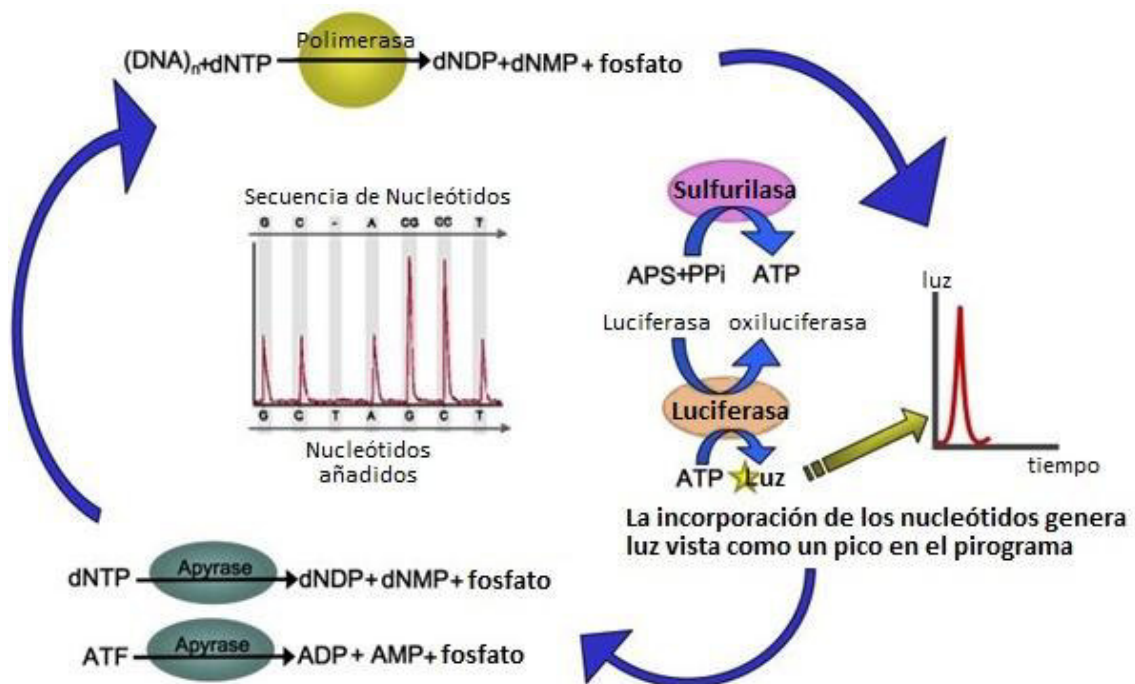


Fig 6. Química de la pirosecuenciación. Se muestran las reacciones bioquímicas y las enzimas involucradas en la generación de señales de luz de la pirosecuenciación. Cada pico en los pirogramas representa un pulso de luz detectado por el instrumento. Figura modificada de Petrosino et al., 2009.

- Preparación de Librerías:** La preparación de las librerías fue realizada tomando 500 ng de cada plásmido y llevándolo a un volumen de 100 μL de *buffer* TE (10 mM Tris pH 8.0 y 1mM de EDTA). Luego cada plásmido fue fragmentado por nebulización y se generaron las librerías con el kit GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche), utilizando los MIDs del kit GS FLX Titanium Rapid Library MID Adaptors (Roche).
- PCR en emulsión (emPCR):** Para la PCR, recuperación de las perlas, lavado y el enriquecimiento se utilizó el kit GS Junior Titanium emPCR Kit (Roche).
- Secuenciación:** Se ensambló el *Bead Deposition Device* con la placa *PicotiterPlate device* (esta placa contiene pequeños pocillos donde idealmente solo entra una *bead* proveniente del emPCR por cada uno de estos pocillos), luego se rellenan las *beads* de las

muestras junto con los otros tipos de *beads* de los kits GS Junior Titanium Control Bead Kit y del GS Junior Titanium Sequencing Kit. Finalmente, la placa cargada con las *beads* es colocada en el equipo GS Junior system (Roche) y se procedió a la secuenciación mediante el programa GS Junior sequencer.

- d) Análisis de datos: Para el procesamiento de los datos (conversión de las señales de luz en secuencias de DNA) se utilizó el programa GS Run Browser y para el análisis y ensamblaje de los datos se utilizó el programa GS Reference Mapper Software.

4.2.2 Estandarización de la Transfección

4.2.2.1 Preparación del PEI25: Ya que la transfección debió realizarse a gran escala, el uso de reactivos clásicos de transfección como la lipofectamina, un lípido catiónico, es muy costoso, es por esto que se utilizó como alternativa la polietilenimina (PEI), el cual es un polímero catiónico utilizado como vehículo para mediar la entrada de ácidos nucleicos (DNA, RNA y siRNA) a células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Di Gioia & Conese, 2009). Sin embargo, no existen reportes de transfecciones con PEI en células aviares, incluyendo DF-1, por lo que fue necesario una estandarización para encontrar condiciones adecuadas para realizar la posterior transfección a gran escala. El tipo de PEI utilizado fue una versión ramificada de 25 kDa de peso molecular (PEI25) (Sigma-Aldrich). La estructura química del PEI25 ramificada se puede observar en la figura 7.

La solución de uso de PEI25 fue preparada diluyendo el PEI25 1:1000 (w/v) en agua ultrapura y filtrando la mezcla por un filtro de 0.22 μm . La concentración final de la solución de uso fue de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Luego se alicuotó la mezcla en tubos de 1.5mL y se guardó a 4°C para periodos de almacenamiento corto (hasta 3 meses) y a -80°C para periodos largos (más de 3 meses).

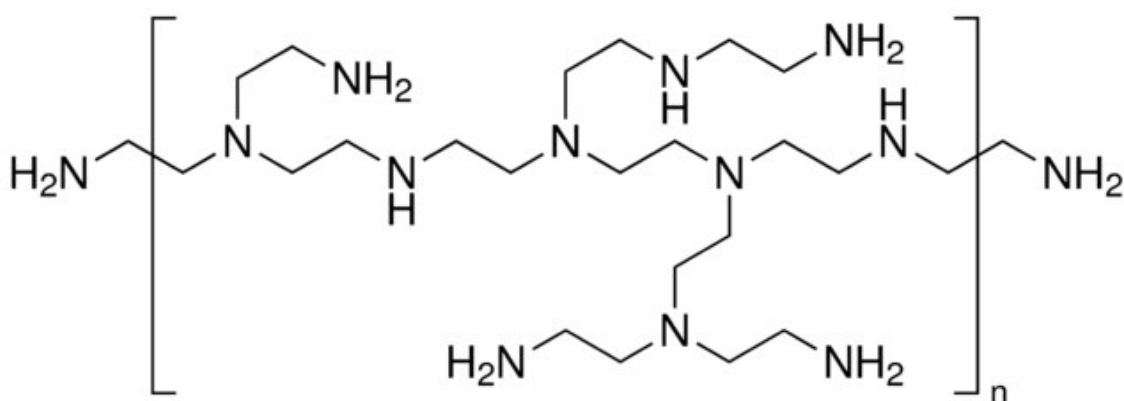


Fig. 7: Estructura química del PEI25 ramificado. Se puede observar la presencia de varios grupos amino ($-NH_2$) que le otorgan una carga neta positiva al PEI25, lo que le permite interactuar con el DNA (de carga negativa). Figura tomada de Jin et al., 2014.

4.2.2.2 Mantenimiento y sembrado de Células DF-1: Las células aviares DF-1 fueron mantenidas a $37^\circ C$ y 5% de CO_2 en Frascos T-25, T-75 o T-225 utilizando 5, 15 ó 40 mL de medio DMEM suplementado al 5% de SFB, respectivamente (a partir de aquí las cantidades dadas están en este orden). Los repiques fueron hechos cada 3 ó 4 días, sembrando al menos 5.0×10^5 , 1.5×10^6 ó 4.5×10^6 células totales por frasco de cultivo para células eucariotas. Para cada repique, primero se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con 2.0, 5.0 ó 10.0 mL de PBS, luego de retirado el PBS se agregó 0.5, 1.0 ó 2.0 mL de tripsina-EDTA y se dejó incubar a $37^\circ C$ de 2 a 5 minutos para luego ser inactivada con la adición de 4.5, 9.0 ó 18.0 mL de DMEM 5%-SFB. Las células ya en suspensión fueron contadas en cámara de Neubauer y sembradas según sea necesario. Para los ensayos de transfección la cantidad de células sembradas fue realizada de acuerdo a la tabla 4. Las células fueron sembradas un día antes de la transfección para que la adherencia y confluencia (entre 80-90%) de las células sea óptima.

4.2.2.3 Transfección: Para determinar las condiciones óptimas de transfección hemos utilizado el plásmido pcDNA3.1-EGFP que expresa la EGFP como gen reportero, facilitando así la visualización de la eficiencia de transfección. La estandarización se realizó en dos etapas: (i) Transfección exploratoria en placas de 12-well, en la cual

se utilizó un rango amplio de cantidades de PEI25, que iba desde 1 µg hasta 50 µg de PEI25 y de 1 µg a 2 µg de DNA por pocillo. La evaluación se hizo de manera cualitativa en un microscopio invertido con fluorescencia. (ii) Transfección en frasco T-25, donde se escalaron las mejores condiciones obtenidas en la etapa anterior. Se evaluó de manera cuantitativa, midiendo el % de células fluorescentes usando citometría de flujo.

Tabla 4: Cantidad de células y volúmenes utilizados para sembrar los recipientes antes de la transfección. Se muestra también el área, en cm², de cada tamaño de recipiente usado para sembrar las células un día antes de realizar las transfecciones.

	Área (cm ²)	Volumen (mL)	Células (x10 ⁶)
12 pocillos^(*)	3.8	1.0	0.20
Frasco T-25	25.0	5.0	1.25
Frasco T-225	225.0	40.0	11.25

(*) Se consideran las cantidades de un solo pocillo.

Para los ensayos realizados en placas de 12 pocillos se sembraron células DF-1, de acuerdo a lo descrito en el punto 4.2.2.2, veinticuatro horas después se transfectaron con las mezclas DNA-PEI25. Para cada pocillo, estas mezclas fueron realizadas de la siguiente manera: en el tubo “A” se colocó 200 µl de OPTIMEM I (Thermo Scientific) con 1 µg o 2 µg de DNA plasmídico (plásmido pcDNA3.1-EGFP) y en el tubo “B” 200 µl de OPTIMEM I con la cantidad correspondiente de PEI25. Luego los tubos “A” y “B” fueron mezclados generando el tubo “C” y se les dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Durante el tiempo de incubación, el medio de cultivo de cada pocillo fue removido y la monocapa de células fue lavada con 500 µl de PBS. Una vez retirado el PBS, se añadió el contenido total del tubo “C” (poco más de 400 µl) sobre las células y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 4 horas. Finalmente, la mezcla de transfección fue removida de la monocapa, se lavó con PBS y se agregó medio DMEM 5%-SFB fresco.

Para los ensayos en frasco T-25, se sembraron células DF-1 y se escalaron las cantidades de reactivos usados en base al área. El área de un Frasco T-25 es aproximadamente 6.6 veces el área de un pocillo de una placa de 12 pocillos. Por eso, la transfección en Frasco T-25 se realizó utilizando 13.2 µg de plásmido pcDNA3.1-EGFP. Para cada Frasco T-25, la mezcla de transfección fue realizada de la siguiente manera: en el tubo “A” se colocó 1000 µl de OPTIMEM I con 6.6 µg de DNA plasmídico y en el tubo “B” 1000 µl de OPTIMEM I con la cantidad correspondiente de PEI25. Luego los tubos “A” y “B” fueron mezclados generando el tubo “C” y se les dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, el medio de cultivo de cada Frasco fue removido y la monocapa de células fue lavada con 2 ml de PBS. Una vez retirado el PBS, se añadió el contenido total del tubo “C” (poco más de 2000 µl) sobre las células y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 4 horas. Finalmente, la mezcla de transfección fue removida de la monocapa, se lavó con PBS y se agregó medio DMEM 5%-SFB fresco. Todos los ensayos de transfección fueron llevados a cabo con plásmidos de alto grado de pureza, obtenidos con el kit - QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN).

4.2.2.4 Microscopía de Fluorescencia: Las células transfectadas con el plásmido que codifica EGFP, se examinaron y fotografiaron con un microscopio Observer.A1 (Zeiss) invertido provisto del sistema Colibri.2 con lámparas led de intensidad regulable continua. Para la observación de la fluorescencia se utilizó la lámpara de luz azul (longitud de onda de 470 nm) y para el registro de imágenes se usó una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss), incorporada al microscopio. Para tomar y procesar las microfotografías se utilizó el programa ZEN2012 edición azul (Zeiss). Ver figuras 13, 14, 15,16 y 20.

4.2.2.5 Citometría de Flujo: Se utilizó este ensayo para cuantificar el porcentaje de células que expresaron la EGFP. Para este ensayo las células transfectadas en Frasco T-25 con diferentes proporciones de DNA-PEI25 fueron cosechadas a las 48 horas. Para cosechar las

células de cada frasco T-25, primero se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con 2.0 ml de PBS, luego de retirado el PBS se agregó 0.5 ml de tripsina-EDTA y se dejó incubar a 37°C de 2 a 5 minutos para luego ser inactivada con la adición de 4.5 ml de DMEM 5%-SFB. Las células en suspensión fueron analizadas el mismo día en el Citómetro de Flujo Gallios (Beckman-Coulter). La excitación de la EGFP se hizo con el láser azul (488nm) y la señal de fluorescencia se capturó en la región FL1 a 514-545 nm, analizando por lo menos 10000 células por muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos fueron procesados con el programa Kaluza.

4.2.2.6 Análisis estadísticos: El análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo se realizó con el programa GraphPad Prism 6. Para encontrar si existía diferencia entre los grupos se usó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y para determinar la diferencia entre cada par de grupos se utilizó la prueba no paramétrica para muestras independientes U de Mann-Whitney. Para todos los ensayos se consideró un valor $p \leq 0.05$ como significativo.

4.2.3 Expresión de VLP

4.2.3.1 Transfección a gran escala: En base a las condiciones óptimas encontradas en la estandarización de la transfección, se transfectaron 6 frascos T-225 por cada grupo de plásmidos. En total se transfectaron 3 grupos:

- 1) pVAX1-M + pCI-N + pVAX1-hnFib2
- 2) pVAX1-M + pCI-N + pVAX1
- 3) pCI-N + pVAX1-hnFib2 + pVAX1

Para cada frasco T-225 se transfectaron 120 µg de DNA (40 µg de cada plásmido a la vez) con 120 µl de PEI25 en un volumen final de 15 ml de OPTIMEM I. El plásmido pVAX1 es el vector plasmídico vacío que se utilizó en los grupos 1 y 2 para igualar las cantidades de DNA transfectadas en cada frasco T-225. Luego de 4 horas se retiró la mezcla de transfección, se lavó la monocapa con PBS, se cultivó en

40 ml de medio DMEM 5%-SFB y se dejó incubando a 37°C y 5% CO₂. A las 48 y 96 horas de incubación se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco. El medio que había sido retirado fue clarificado a 2000 RCF por 5 minutos y el sobrenadante se guardó a 4°C. A los 6 días de incubación el medio fue retirado de los frasco e igualmente fue clarificado y guardado a 4°C.

4.2.3.2 Purificación de los VLP: Se realizó modificando un protocolo anteriormente descrito para la purificación de VLP de NDV (McGinnes & Morrison, 2013). Los sobrenadantes de los tres grupos transfectados, según se indica en el punto 4.2.3.1, tomados a las 48, 96 y 144 horas fueron clarificados, juntados y peleteados por ultracentrifugación en el rotor Type 19 (Beckman-Coulter), usando botellas de propileno de 250 ml (Beckman-Coulter) a 18000 RPM por 16 horas, el sedimento resultante fue resuspendido en *buffer* TNE (ver Anexo 1), homogenizado por pipeteo, y cargado encima de una gradiente discontinua de sucrosa compuesta de 2ml de sucrosa al 65% y 4ml de sucrosa al 20%. Las gradientes fueron centrifugadas en el rotor SW28 (Beckman) a 24000 RPM por 6 horas. La capa “esponjosa” situada en la interface entre 20% y 65% de sucrosa, contiendo los VLPs, fue colectada, mezclada con 2 volúmenes de sucrosa al de 80% y colocada encima de una capa de 1ml de sucrosa al 80% en un tubo de centrífuga SW41 (Beckman-Coulter), y luego se colocaron en la parte superior capas de 3.5ml de sucrosa al 50% y 2 ml de sucrosa al 10%. Las gradientes fueron centrifugadas a 38000 RPM por 18 horas. Los VLPs, los cuales flotan en la interface de 50% y 10% de sucrosa fueron colectados, diluidos con PBS y concentrados por ultracentrifugación en el rotor SW41 a 40000 RPM por 20 horas. Finalmente el pellet obtenido fue resuspendido en un volumen final de 500 µl de PBS. La muestra que correspondía al grupo 3 (plásmidos pCI-N + pVAX1-hnFib2 + pVAX1) solo fue concentrada hasta el primer paso, luego se saltó de frente al paso 4, esto con la finalidad de perder la mínima cantidad posible de VLP. Todas las centrifugaciones fueron llevadas a cabo a 4°C en la ultracentrífuga Optima L-100K (Beckman

Coulter). La preparación de las soluciones usadas para la ultracentrifugación se encuentra detallada en el Anexo 1. En la figura 8 se muestra un esquema de los pasos de purificación de los VLPs.

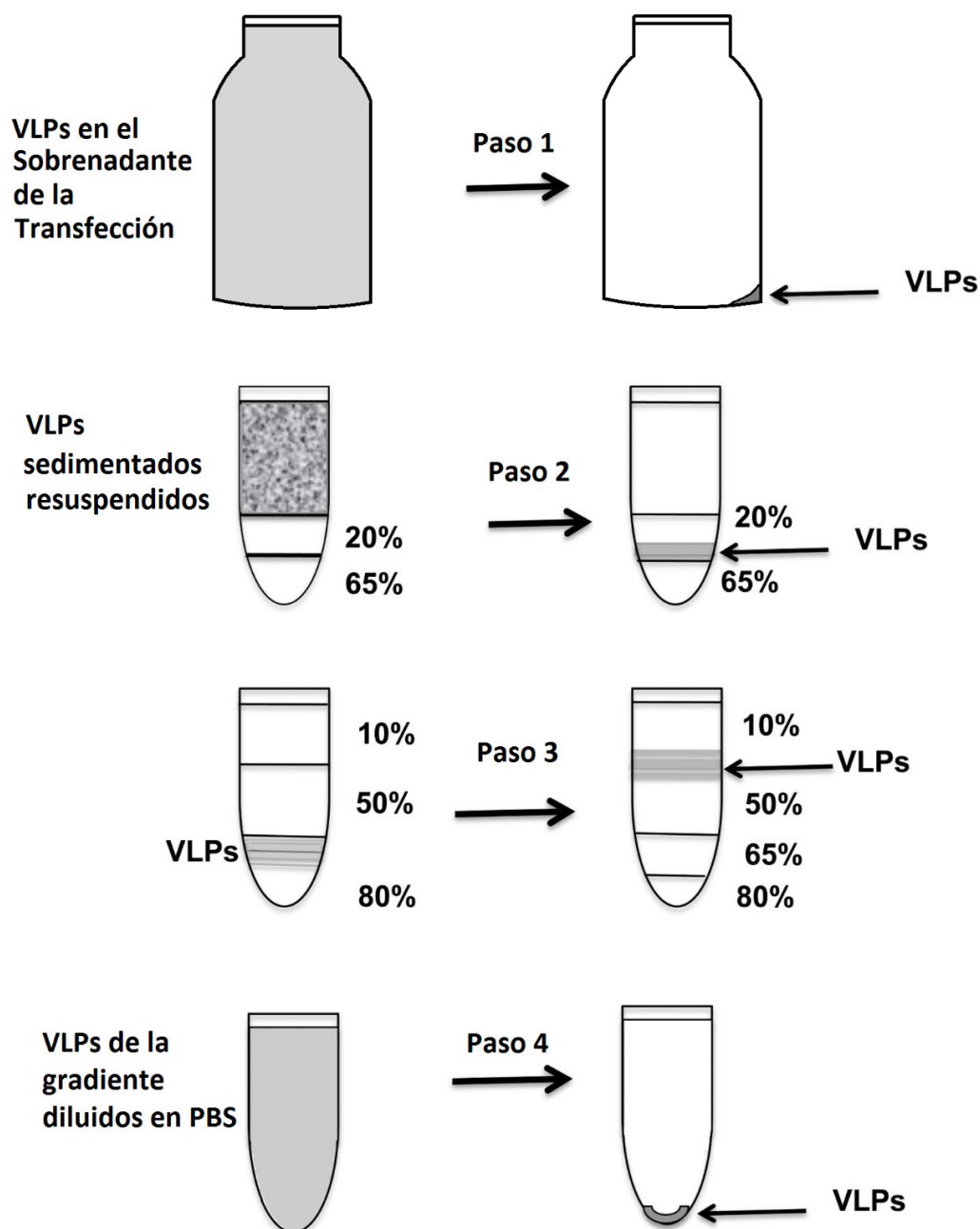


Fig 8. Pasos de Purificación de los VLPs. Se indican las concentraciones de sucrosa utilizadas para cada uno de los pasos de purificación de los VLPs.

4.2.3.3 Western Blot: Para determinar la presencia de las proteínas específicas en los VLPs purificados, estos fueron evaluados por Western Blot. Consistió en 3 pasos: (i) Separación de proteínas por SDS-PAGE; (ii) Transferencia de las proteínas separadas a una

membrana de nitrocelulosa; y (iii) Inmunodetección con anticuerpos específicos.

a) La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE): es una técnica analítica que permite separar proteínas. El SDS-PAGE permite separar las proteínas en base a su peso molecular. La mezcla acrilamida/bis-acrilamida se polimeriza formando una red compleja a través de la que migran las proteínas cuando se le aplica un campo eléctrico. La función del SDS es denaturar y conferir una carga neta negativa a las proteínas, lo que permite que las proteínas sean separadas en base a su peso molecular. En este trabajo, se ha empleado el sistema de electroforesis en cámara vertical mini-PROTEAN II (Bio-Rad), utilizando geles de 2 fases, al 5% (gel concentrador) y al 10% (gel separador), según las condiciones de Sambrook & Russell, 2001.

Procedimiento:

- Preparar los geles de poliacrilamida (tabla 5).
- Preparar las muestras con las proteínas diluyéndolas en *buffer* de carga 5X (ver Anexo 2), luego calentarlas a 98°C por 5 minutos y mantenerlas en hielo.
- Montar los geles en la cubeta de electroforesis, cubrir con el *buffer* de electroforesis 1X (ver Anexo 2) y cargar las muestras de proteínas en los pocillos.
- Correr las muestras a 50 V por 1 hora, luego subir el voltaje a 120 V hasta que el frente de corrida alcance el final del gel.

Tabla 5. Volúmenes necesarios para la preparación de 2 geles de poliacrilamida

Componentes	Gel Separador (10%)	Gel concentrador (5%)
H ₂ O	4.0 ml	3.4 ml
30% Acrilamida/0.8% bis	3.3 ml	0.83 ml
Tris-Cl 1.5M (pH 8.8)	2.5 ml	-
Tris-Cl 1.0M (pH 6.8)	-	0.63 ml
10% SDS	0.1 ml	0.05 ml
10% Persulfato de amonio	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml

b) Transferencia o *Blotting*: Una vez que las proteínas estuvieron separadas por SDS-PAGE, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante una segunda electroforesis realizada con alto voltaje en dirección al eje mayor del gel. De esta manera las proteínas migran y quedan adheridas en la membrana en la misma posición y orden que ocupaban en el gel de acrilamida. Se siguió de según las condiciones de (Sambrook & Russell, 2001).

Protocolo:

- Retirar el gel concentrador del gel de poliacrilamida proveniente de la electroforesis y equilibrar el gel separador 30 minutos a temperatura ambiente con *buffer* de transferencia (ver Anexo 2).
- Llenar la cámara de electroforesis con *buffer* de transferencia. Armar el “sándwich” de transferencia, en el orden mostrado en la figura 9, bajo el *buffer* de transferencia para evitar que se atrapen burbujas.
- Colocar sobre el soporte del “sándwich” la esponja remojada en *buffer* de transferencia y sobre esta un papel filtro también remojado en *buffer* de transferencia.
- Colocar el gel encima del papel filtro, remover las burbujas entre el gel y el papel filtro haciendo rodar suavemente un tubo de ensayo sobre la superficie del gel (este lado se convierte arbitrariamente en el cátodo).
- Colocar la membrana de nitrocelulosa cuidadosamente en agua en un ángulo de 45° para mojar la superficie total de la membrana y evitar burbujas.
- Equilibrar la membrana de nitrocelulosa de 10 a 15 minutos en *buffer* de transferencia y colocar la membrana directamente en la parte superior del gel. Remover todas las burbujas.
- Embeber otro papel filtro en *buffer* de transferencia y colocar la membrana directamente en la parte superior y

colocarlo en el ánodo, colocar otra esponja sobre el papel filtro y completar el armado de la cámara.

- Llenar el tanque con *buffer* de transferencia y colocar el “sándwich” de transferencia en la orientación correcta. Ajustar el nivel del *buffer* transferencia hasta que cubra el panel de los electrodos.
- Las proteínas fueron transferidas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa por 60 minutos a 100V a 4°C.

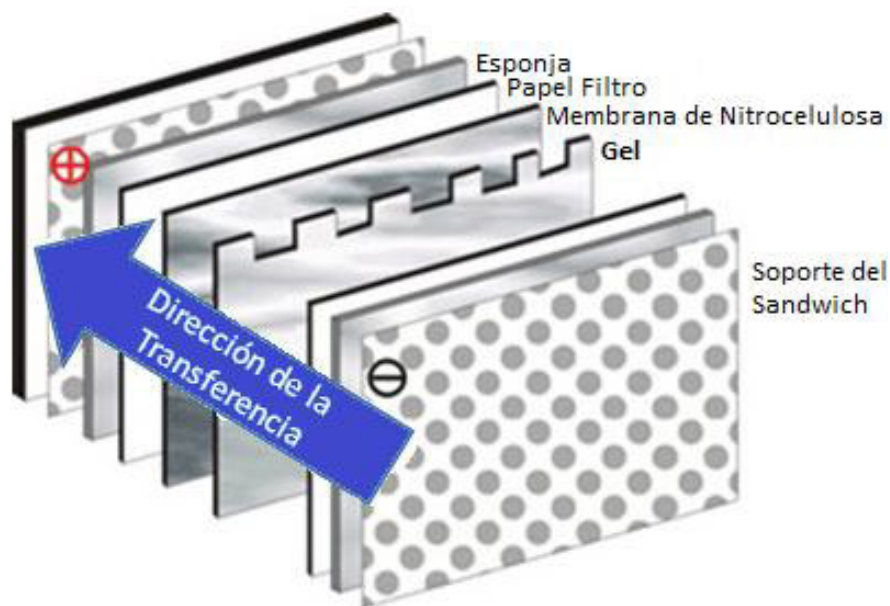


Fig 9. Armado del “sándwich” de Transferencia. Figura modificada de http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=aplicacion_western_blot&opc=introduccion

c) Inmunodetección: La detección de las proteínas de los VLPs fue detectada por anticuerpos específicos, el primero contra las proteínas de NDV y el segundo contra la proteína Fibr-2 de FAdV. Para la detección de las proteínas M y N de NDV se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal de pollo anti-NDV (Abcam) y como secundario se usó un anticuerpo anti-IgY de pollo conjugado con HRP (Abcam). Para la detección de la proteína hnFib2 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo contra el epítipo CDSATMGNRPGDLNS de Fibr-2 de FAdV-4, desarrollado a pedido por GenScript (Piscataway, NJ, USA) y

como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Abcam). El protocolo de inmunodetección seguido en este trabajo se realizó de acuerdo al protocolo descrito por (Ausubel et al., 2002).

Protocolo:

- Colocar la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas en un recipiente del mismo tamaño y agregarle 5 ml de *buffer* de bloqueo (Anexo 2). Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- Diluir el anticuerpo primario en 5 ml de *buffer* de bloqueo, 1:2500 para el anticuerpo anti-NDV y 1:5000 para el anticuerpo anti-Fibra-2.
- Reemplazar el *buffer* de bloqueo del recipiente que contiene la membrana y agregarle el anticuerpo primario e incubar toda la noche en agitación a temperatura ambiente.
- Descartar el anticuerpo y lavar la membrana 3 veces con 10 ml de TTBS (Anexo 2) por 5 minutos en cada lavado.
- Diluir en *buffer* de bloqueo el anticuerpo secundario 1:5000 (para ambos anticuerpos en este estudio), agregarlo sobre la membrana previamente lavada e incubarlo en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
- Descartar el anticuerpo y lavar la membrana 3 veces con 10 ml de TTBS por 5 minutos en cada lavado
- Revelar la membrana agregándole el sustrato DAB (Sigma-Aldrich) que al interactuar con el HRP (presente en los anticuerpos secundarios) da marcas de color marrón al ser positivo.

5. RESULTADOS

5.1 Verificación de la construcción de los vectores plasmídicos:

En este trabajo se construyeron 4 plásmidos diferentes (pcDNA3.1-EGFP, pCI-N, pVAX1-M y pVAX1-hnFib2), cada uno codificando una proteína distinta. Durante la etapa de clonamiento se obtuvieron varias colonias resistentes a los antibióticos de selección ampicilina (para pcDNA3.1 y pCI) o kanamicina (para pVAX1) según fue conveniente. De estas colonias, que potencialmente contenían los plásmidos clonados, se seleccionaron 2 colonias de cada una para ser digeridas con las mismas enzimas de restricción con las que fueron clonadas, excepto por el plásmido pVAX1-hnFib2. Para este último plásmido, el sitio *NheI* usado para clonar el fragmento que contenía el ORF de la proteína hnFib2 fue destruido, por lo que se usaron las enzimas *BssHII* (dentro del ORF de hnFib2) y *NotI* para evaluar la inserción del fragmento clonado. El detalle del mapa del plásmido pVAX1-hnFib2 se muestra en la figura 12D. Los plásmidos fueron digeridos y corridos en un gel de agarosa al 1% y visualizados con SYBR safe. En todos los casos los plásmidos evaluados mostraron el patrón esperado, como se observa en la figura 10.

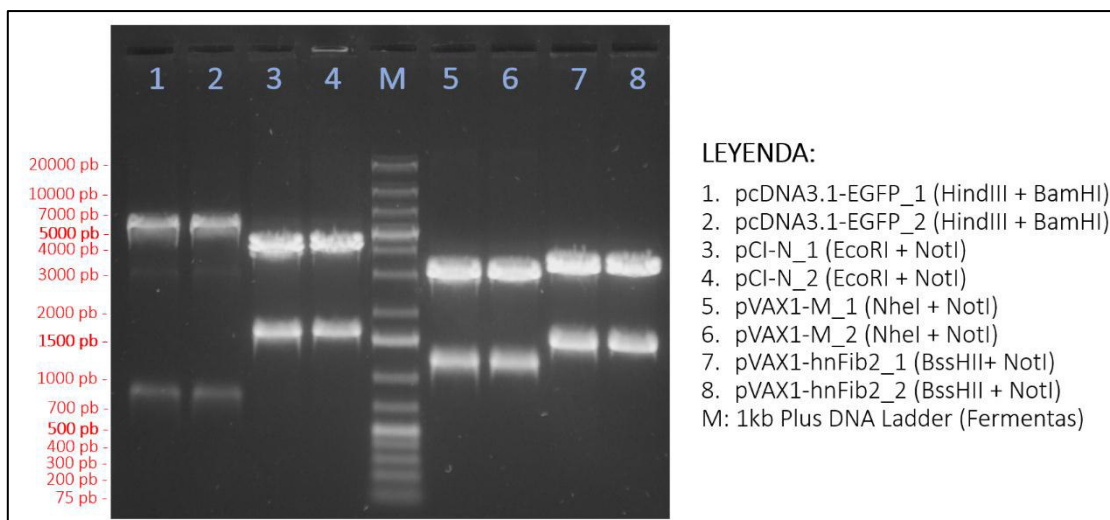


Fig. 10: Electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los plásmidos digeridos. Los plásmidos recombinantes fueron digeridos con las enzimas de restricción con los que fueron clonados, excepto los plásmidos pVAX1-hnFib2 los cuales fueron digeridos con *BssHII* en lugar de *NheI*, porque el sitio para *NheI* fue destruido al insertar el fragmento que contenía al ORF de hnFib2. En la leyenda se muestran dentro de los paréntesis las enzimas usadas para digerir a cada plásmido. Todos los plásmidos mostraron las bandas de los tamaños esperados. Los tamaños moleculares de las bandas del marcador (carril M) se muestran al lado izquierdo de la imagen en letras rojas.

De los plásmidos verificados por digestión enzimática se escogió uno de cada tipo para ser secuenciado en el GS Junior system (Roche). El ensamblaje de cada uno de los cuatro plásmidos secuenciados fue realizado utilizando como referencia su respectiva secuencia teórica, utilizando el programa GS Reference Mapper Software. Este programa alinea los 'reads' con la referencia dada, por lo que el ensamblaje es bastante bueno y rápido. Una figura representativa del ensamblaje de uno de los plásmidos es mostrada en la figura 11. El ensamblaje de todos los plásmidos tuvo una cobertura promedio mayor a 80X y una calidad promedio mayor a un Q50 (99.999% de confianza). La totalidad de las secuencias de los plásmidos fue cubierta por la secuenciación, generando los mapas mostrados en la figura 12. El resumen de los datos obtenidos de la secuenciación de los plásmidos es mostrado en la tabla 6.

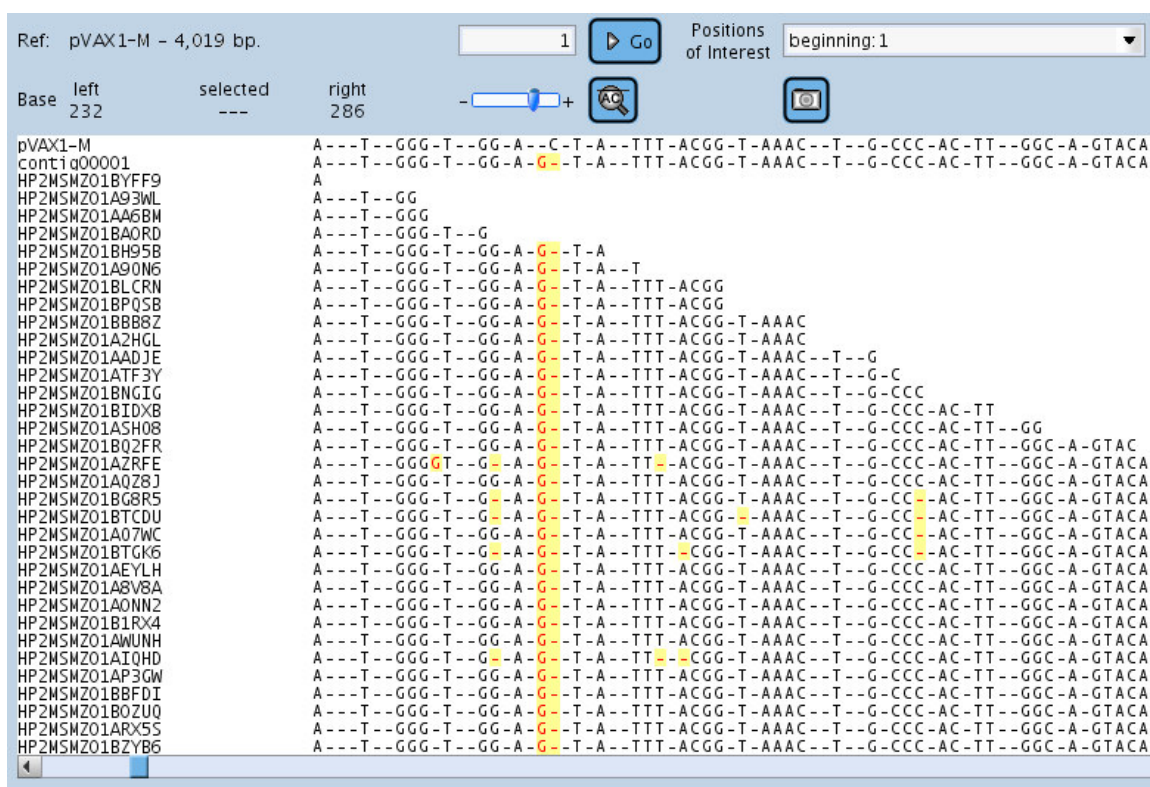


Fig. 11: Ensamblaje de los plásmidos secuenciados. Se muestra una porción del ensamblaje del plásmido pVAX1-M, donde se puede observar que la guanina resaltada en amarillo es un cambio nucleotídico que se repite en todas las lecturas mostradas. Esta mutación corresponde a una transversión en la posición 241 del plásmido.

En los cuatro plásmidos construidos en este trabajo se encontraron variaciones nucleotídicas, que son mostradas en la tabla 7. La mayoría de estas variaciones están en regiones no codificantes del plásmido, por lo que

no debería afectar la expresión de la proteína de interés, y tampoco mostraron impacto en el rendimiento de la cantidad de plásmido obtenido, mientras que las únicas 2 mutaciones en regiones codificantes fueron observadas en el ORF de la nucleoproteína (ver tabla 7). Sin embargo, estas variaciones en la nucleoproteína fueron mutaciones sinónimas (sin cambio de aminoácido) con respecto a la referencia usada del Genbank.

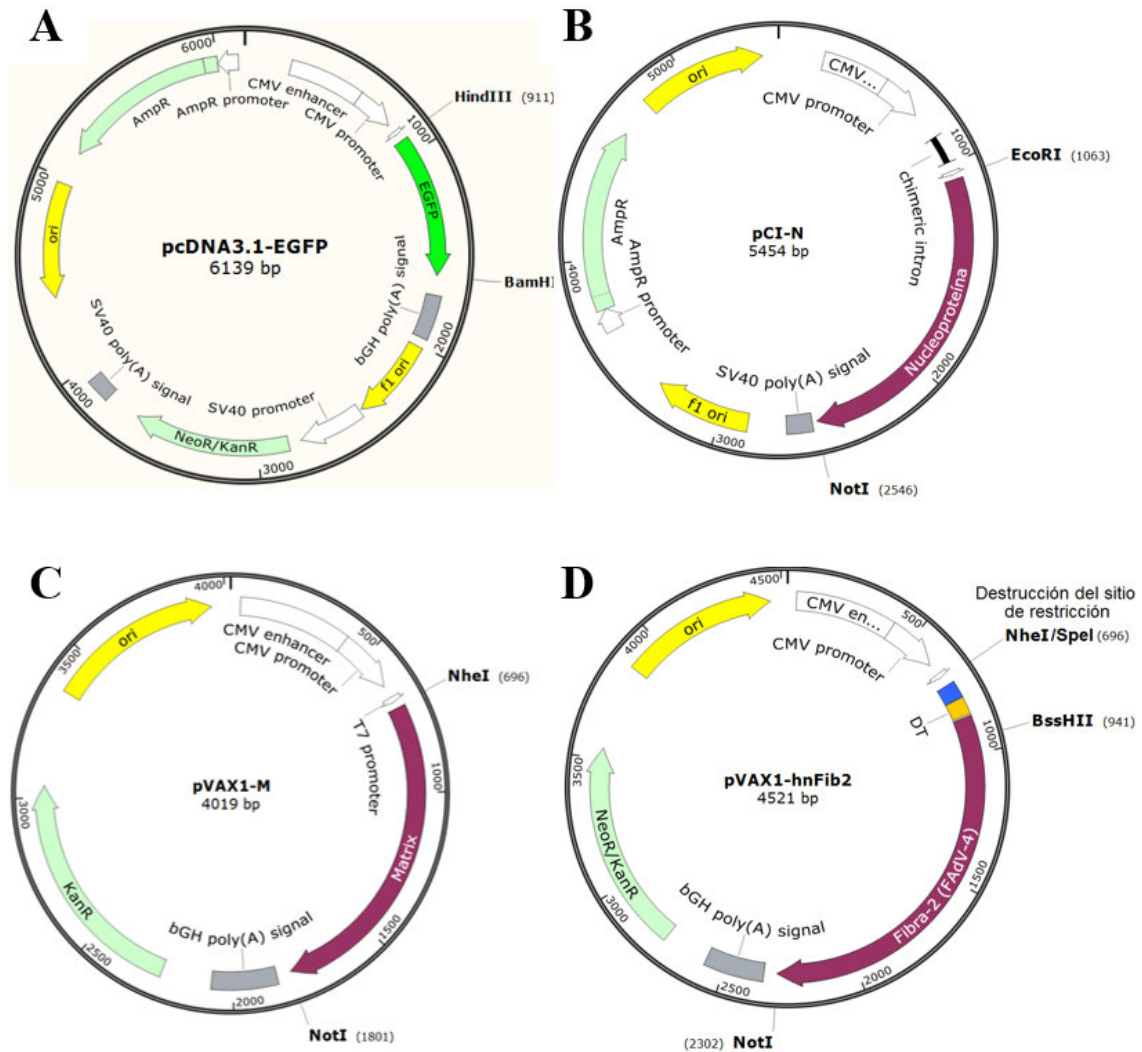


Fig. 12. Mapa de los plásmidos secuenciados. (A) constructo final pcDNA3.1-EGFP de 6139 pb. **(B)** constructo final pCI-N de 5454 pb. **(C)** constructo final pVAX1-M de 4019 pb. **(D)** constructo final pVAX1-hnFib2 de 4521 pb. AmpR = gen de resistencia a la ampicilina; KanR = gen de resistencia a Kanamicina; ori = sitio de origen (en amarillo). DC = Dominio Transmembrana; DT = Dominio Citoplasmático.

Tabla 6. Resumen de los datos obtenidos de la secuenciación de los plásmidos recombinantes

Plásmido	Tamaño esperado (pb)	Tamaño obtenido (pb)	Cobertura promedio	Calidad >Q50
pcDNA3.1-EGFP	6139	6139	143.3X	Si
pCI-N	5454	5454	130.8X	Si
pVAX1-M	4019	4018	107.2X	Si
pVAX1-hnFib2	4521	4520	82.5X	Si

Tabla 7: Variaciones nucleotídicas de los plásmidos recombinantes. Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron secuenciados en el GS Junior system (Roche), donde se encontró las siguientes variaciones nucleotídicas entre la referencia (secuencias ideales de los plásmidos) y los plásmidos construidos.

Plásmido	Posición en referencia	base de referencia	variación	Cobertura	Característica
pcDNA3.1-EGFP	4420	C	G	152	Ori
	4421	A	G	152	Ori
pCI-N	1542	A	G	136	N ORF, sin cambio de aa
	2019	G	T	145	N ORF, sin cambio de aa
pVAX1-M	2	A	C	96	Sin función
	3	C	T	96	Sin función
	4	T	G	97	Sin función
	241	C	G	126	Promotor CMV
	2180	C	T	110	5' del ORF de la KanR
	3113	A	-	117	3' del ORF de la KanR
	3514	C	T	113	Ori
	4491	G	C	109	Sin función
pVAX1-hnFib2	2	A	C	85	Sin función
	3	C	T	85	Sin función
	4	T	G	85	Sin función
	241	C	G	77	Promotor CMV
	2680	C	T	92	5' del ORF de la KanR
	3614	A	-	81	3' del ORF de la KanR
	4015	C	T	78	Ori
	4491	G	C	74	Sin función

5.2 Condiciones óptimas de transfección:

La estandarización de la transfección se desarrolló en 2 pasos: en el primer paso se realizó una transfección en placas de 12 pocillos con 2 cantidades distintas del plásmido pcDNA3.1-EGFP (1 y 2 µg de DNA por pocillo) y 6

cantidades de PEI25 (1, 5, 10, 15, 20 y 25 µg por pocillo), obteniéndose un total de 12 condiciones que fueron evaluadas cualitativamente; El segundo paso fue realizado en frascos T-25, tomando la mejor condición obtenida en el ensayo anterior como punto de partida para realizar otras proporciones de DNA/PEI25, que luego fueron evaluadas cuantitativamente por citometría de flujo.

a) Primer ensayo de transfección: se observó que cuando se utilizó 1 µg de PEI25 por pocillo la transfección fue poco eficiente, tanto con 1 µg como con 2 µg de DNA. En general, cuando se comparó dos pocillos que tienen la misma cantidad de PEI25 pero diferentes cantidades de DNA se observó mayor proporción de células fluorescentes en las que fueron transfectadas con 2 µg de DNA que cuando se utilizó solo 1 µg de DNA. Estos resultados pueden observarse en la figura 13. Otra observación interesante fue que en altas cantidades el PEI25 no produjo mejores eficiencias de transfección, sino por el contrario disminuyó la eficiencia de transfección drásticamente (ver figuras 13E, 13F, 13K y 13L).

Por otro lado, el efecto citotóxico fue aumentando de manera directamente proporcional a la cantidad de PEI25 utilizada, el cual fue evidente a cantidades de PEI25 iguales o mayores a 15 µg, para las células DF-1 observadas a las 48 horas post transfección (figuras 14D-14F y 14J-14L). Esto puede estar relacionado a la baja eficiencia de transfección que se observó en estos tratamientos.

Para este primer ensayo la condición con mayor cantidad de células fluorescentes fue observada cuando se utilizó 2 µg de DNA con 5 µg de PEI25 (Figura 13H). Y dado que un pocillo de una placa de 12 pocillos tiene un área de 3.8 cm² (ver tabla 4), entonces la mejor condición de transfección, en este primer ensayo, equivalió a utilizar 0.53 µg de DNA por 1 cm² y a 1.33 µg de PEI25 por cm² de células DF-1 sembradas. Estos datos fueron utilizados para el siguiente ensayo de transfección.

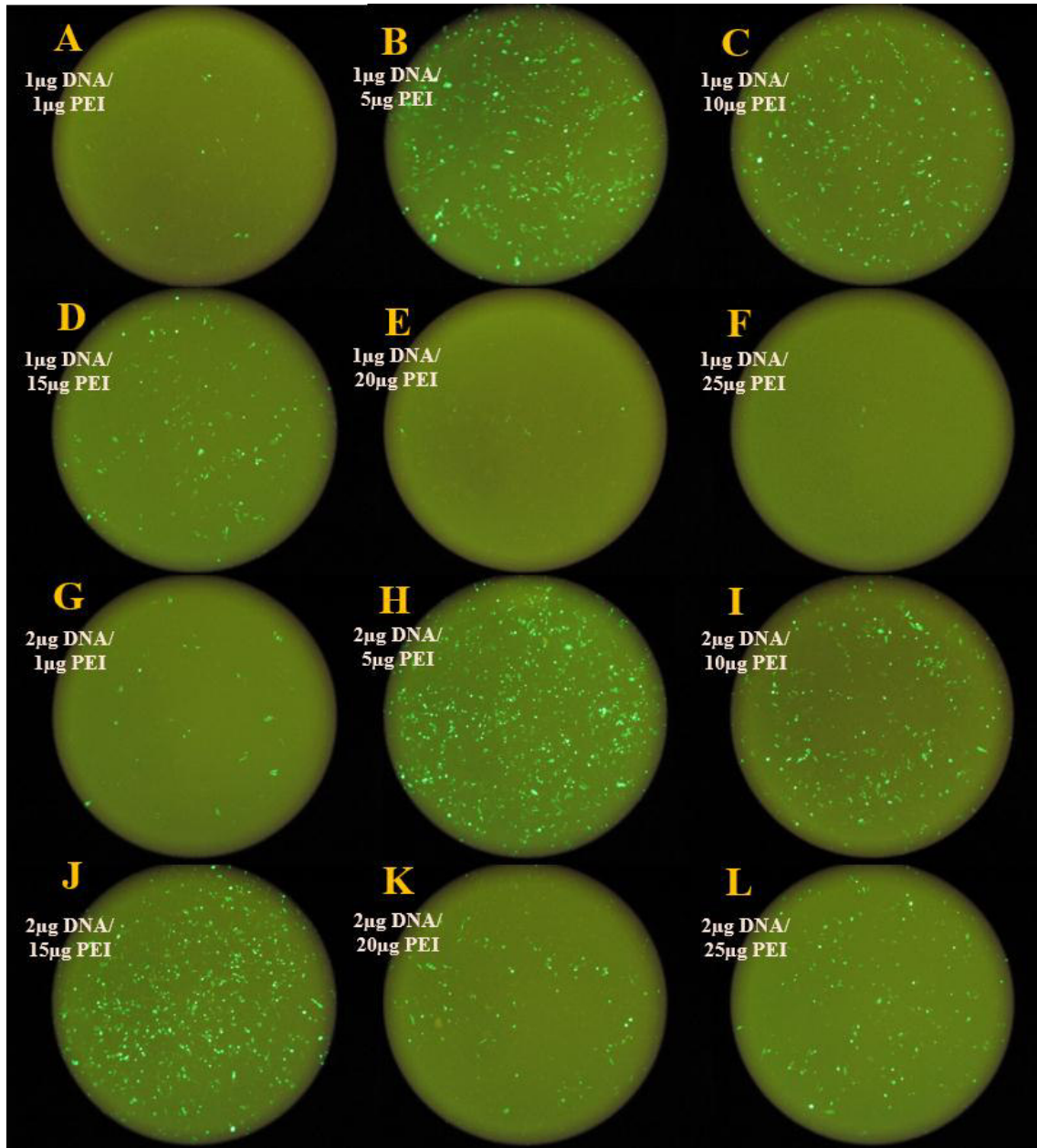


Fig. 13: Primer ensayo de transfección en células DF-1 observadas en fluorescencia. Las células fueron transfectadas con 1µg (A-F) o 2µg (G-L) del plásmido pcDNA3.1-EGFP, junto con 1, 5, 10, 15, 20 ó 25µg de PEI25 por pocillo en una placa de 12 pocillos sembrada con células DF-1 entre 80 y 90% de confluencia. Todas las fotos fueron tomadas en un microscopio invertido a un aumento de 100X, utilizando luz azul (470nm) para la excitación de la EGFP.

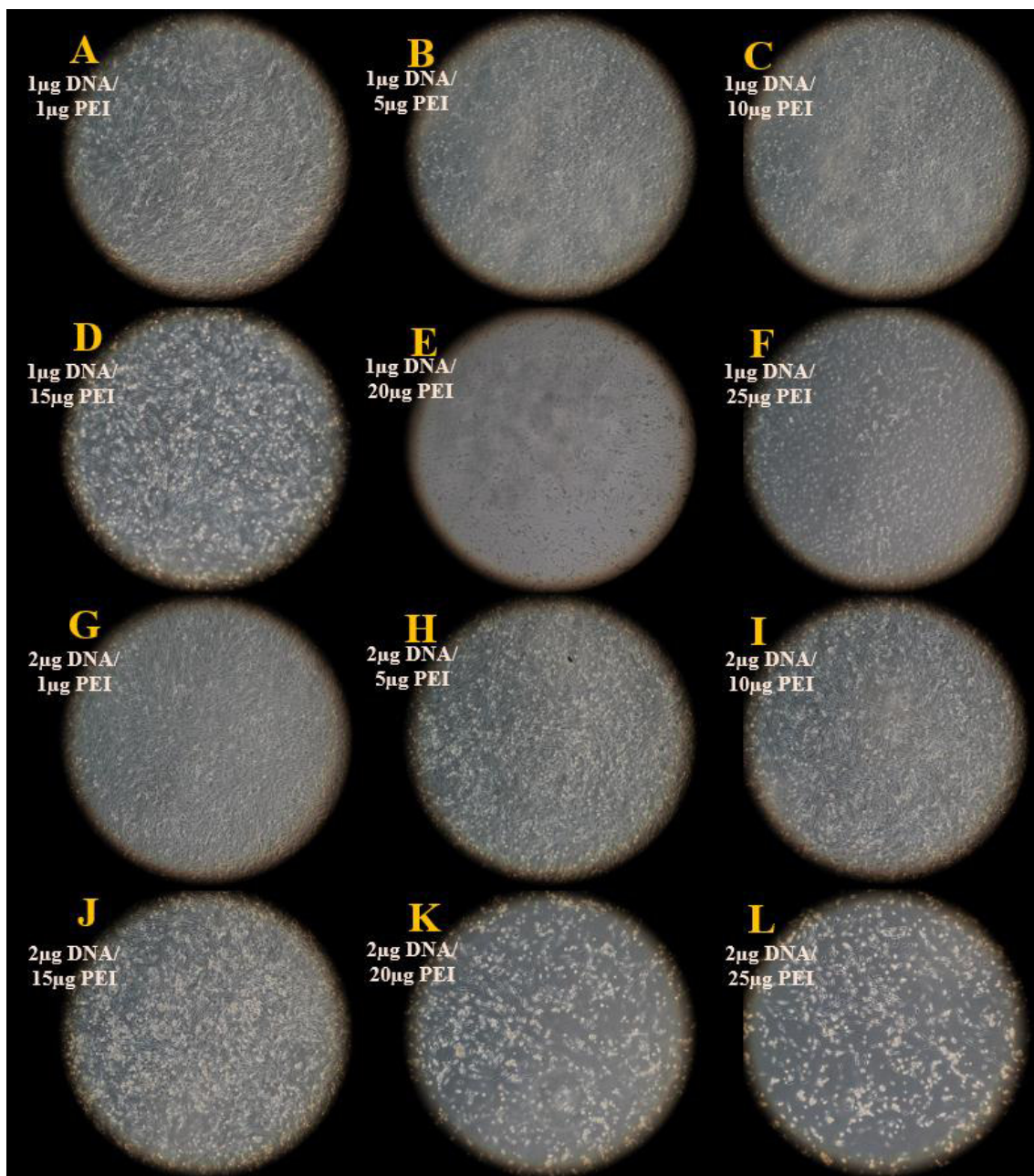


Fig. 14: Primer ensayo de transfección en células DF-1 observadas en un microscopio con contraste de fase. Las células fueron transfectadas con 1 µg (A-F) o 2 µg (G-L) del plásmido pcDNA3.1-EGFP, junto con 1, 5, 10, 15, 20 ó 25 µg de PEI25 por pocillo en una placa de 12 pocillos sembrada con células DF-1 entre 80 y 90% de confluencia. Todas las fotos fueron tomadas en un microscopio invertido a un aumento de 100X.

b) Segundo ensayo de transfección: A partir de la mejor condición observada cualitativamente en el ensayo anterior, es decir cuando se usó 2 µg de DNA y 5 µg de PEI25 por pocillo de placa de 12 pocillos, se evaluaron varias proporciones cercanas a este para determinar cuantitativamente cuál es la condición de transfección óptima que pueda luego se escalada en los ensayos de expresión de los VLP. La evaluación se realizó por

citometría de flujo midiendo el porcentaje de células fluorescentes. Se evaluaron 6 proporciones diferentes de DNA/PEI25 (1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5), donde todos los ensayos se realizaron utilizando 0.53 μg de DNA/ cm^2 , equivalente a utilizar 2 μg de DNA en un pocillo de una placa de 12 pocillos. Dado que este segundo ensayo fue realizado en frascos T-25, la cantidad de DNA utilizada por cada frasco fue de 13.3 μg de DNA. Antes de evaluar el porcentaje de células fluorescentes por citometría de flujo, se observaron las células transfectadas en un microscopio invertido de fluorescencia, siendo muy difícil discriminar por simple inspección cuál es la condición óptima de transfección (ver figura 15). A pesar de ello, las proporciones DNA/PEI25 de 1:3 y 1:3.5 parecían ser las que tuvieron mejor eficiencia de transfección (ver figuras 15E y 15F)

Por otro lado, al igual que en el primer ensayo, se observó cierta citotoxicidad dependiente de la cantidad de PEI25, sin embargo esta no fue tan marcada como en el ensayo anterior debido a que la proporción DNA/PEI25 fue mucho más baja (ver figura 16).

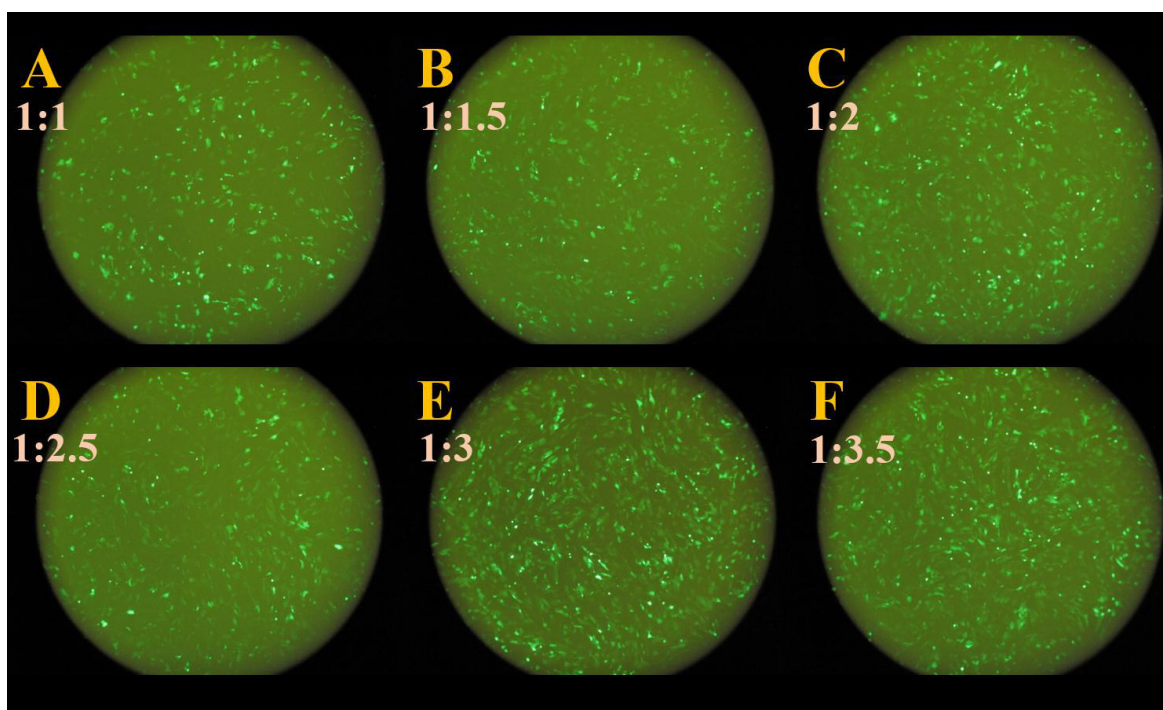


Fig. 15: Segundo ensayo de transfección en células DF-1 observadas en fluorescencia. Las células fueron transfectadas con 0.53 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del plásmido pcDNA3.1-EGFP, junto con PEI25 en proporciones 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5 de DNA/PEI25 (la proporción es indicado en la esquina superior izquierda de cada figura). Todas las fotos fueron tomadas 48 horas post-transfección en un microscopio invertido a un aumento de 100X, utilizando luz azul (470nm) para la excitación de la EGFP.

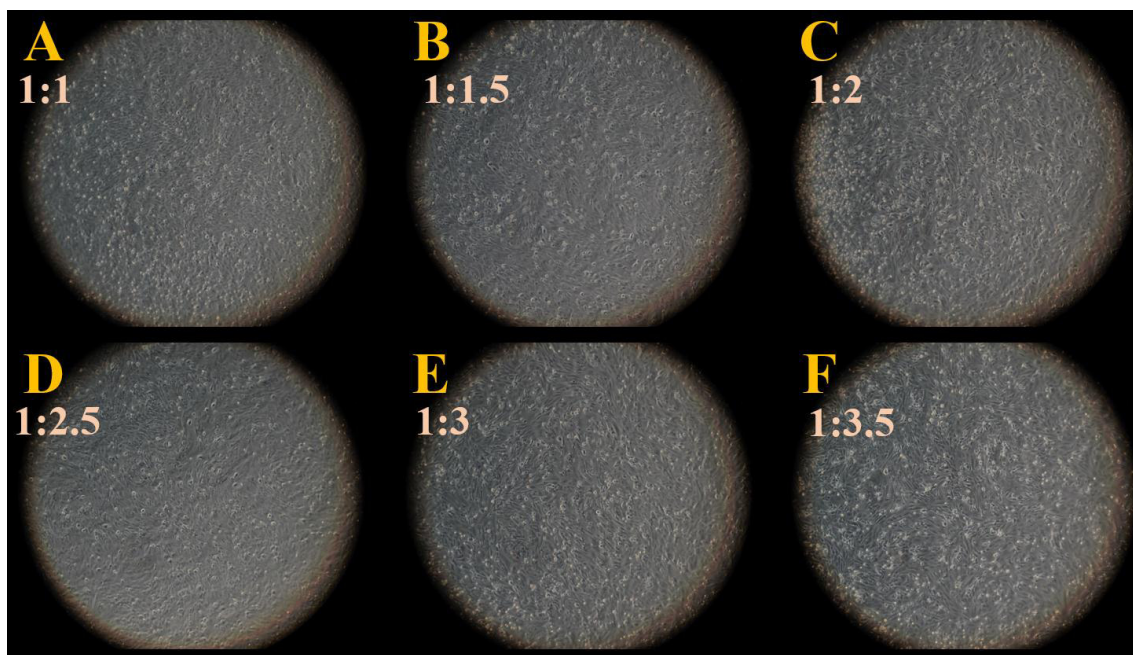
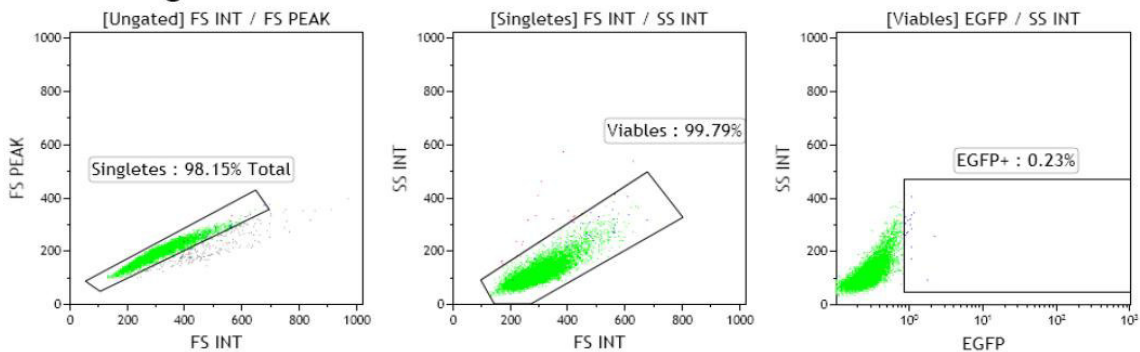


Fig. 16: Segundo ensayo de transfección en células DF-1 observadas en un microscopio con contraste de fase. Las células fueron transfectadas con $0.53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ del plásmido pcDNA3.1-EGFP, junto con PEI25 en proporciones 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5 de DNA/PEI25 (la proporción es indicado en la esquina superior izquierda de cada figura). Todas las fotos fueron tomadas 48 horas post-transfección en un microscopio invertido a un aumento de 100X.

Las células transfectadas con las diferentes proporciones de DNA/PEI25 fueron analizadas por citometría de flujo. Para este análisis, primero se cosecharon las células con tripsina-EDTA, como se describe en el apartado 4.2.2.3, luego las células en suspensión fueron analizadas por el citómetro de flujo. Para el análisis de cada muestra, se tomaron en cuenta solo las células individuales o 'singletes' (ver cuadros de la izquierda de la figura 17). Los singletes pueden ser discriminados enfrentando el área del pico de la señal de dispersión frontal (FS PEAK, del inglés: *Forward scatter peak*) contra el ancho del pico de la dispersión frontal (FS INT, del inglés: *Forward scatter*). Dado que debe existir una correlación entre estos dos parámetros cuando se analizan células individuales, los eventos leídos por el citómetro que corresponden a grupos de 2 ó más células no cumplen con la correlación y salen de la diagonal o pendiente que se forma en el gráfico FS PEAK vs FS INT, tal como se observa en los gráficos de la parte izquierda de la figura 17. Luego dentro de los singletes se seleccionaron solo las células viables. Las células viables fueron seleccionadas enfrentando la dispersión lateral (SS, del inglés:

side scatter) contra el FS INT de las células. La SS mide la complejidad de una célula (Henel & Schmitz, 2007), por lo tanto las células muertas tienden a ser más complejas, debido a que los componentes de las organelas están dispersos en el citoplasma lo que dispersa la luz más que cuando se encuentran ordenados en organelas enteras. En consecuencia, una población de células homogénea tenderá a tener una correlación lineal entre la complejidad y el tamaño, mientras que las células muertas tienden a tener mayor complejidad (alto valor de SS) y mantienen o disminuyen su tamaño (bajo valor de FS). Las células viables fueron seleccionadas de la población de singletes, tal como se muestra en los cuadros del medio de la figura 17. Finalmente, el análisis del porcentaje de células positivas a EGFP fue medido del grupo de células viables, utilizando como control negativo células DF-1 sin transfectar, como se muestra en la figura 17.

Control negativo



1:3 (DNA/PEI25)

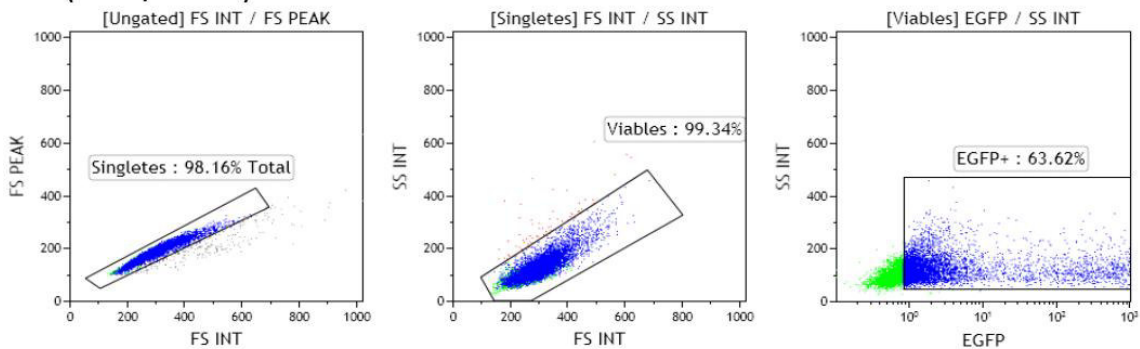


Fig. 17: Análisis por citometría de flujo. La fluorescencia de la EGFP en las células DF-1 transfectadas fue analizada por citometría de flujo. Para el análisis se tomaron en cuenta solo los singletes (cuadros de la izquierda) y células viables (cuadros del medio). La intensidad a la cual las células fueron consideradas EGFP positivas fue definido utilizando células no transfectadas (control negativo), mostrado en el cuadro superior derecho. Los puntos de color azul representan las células positivas a EGFP y los puntos verdes representan las células negativas a EGFP. Los datos fueron procesados en el programa Kaluza.

En la tabla 8 se muestran los porcentajes de células positivas a la EGFP de cada muestra, realizado en 3 ensayos de transfección independientes. En esta tabla se puede observar que la proporción 1:3 de DNA/PEI25 generó en promedio 61.07% de células que expresan EGFP, el cual fue el mayor de todos los grupos evaluados. Para determinar si existían diferencias significativas entre los 6 grupos evaluados se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. El resultado de este análisis se muestra en la figura 18, donde se observa que el valor p arrojado fue de 0.0146, el cual es menor a 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis nula de que las medianas de los grupos son iguales y se asume que existen por lo menos dos grupos con medianas diferentes. Luego se procedió a hacer comparaciones de dos en dos entre todos los grupos evaluados, incluyendo esta vez al control negativo. El estadístico aplicado en este caso fue la prueba no paramétrica para muestras independientes U de Mann-Whitney. Los valores p de este análisis se muestran en la tabla 9. Se observa que respecto al control negativo todos los grupos tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Los grupos transfectados con las proporciones DNA/PEI25 1:1 y 1:2.5 tuvieron medianas significativamente diferentes. Por otro lado, los grupos de las proporciones DNA/PEI25 1:3 y 1:3.5 tuvieron medianas significativamente diferentes a los grupos de proporciones de DNA/PEI25 1:1, 1:1.5, 1:2 y 1:2.5. Esto se aprecia gráficamente en la figura 19, donde se observa que los grupos de las proporciones DNA/PEI25 1:3 y 1:3.5 tuvieron mayores porcentajes de células positivas a EGFP. Además, entre los grupos de proporciones DNA/PEI25 1:3 y 1:3.5 no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas a EGFP. Finalmente, se optó por utilizar la proporción DNA/PEI25 1:3 porque, a pesar de ser estadísticamente igual a la proporción DNA/PEI25 1:3.5, el uso de la menor cantidad de PEI25 es deseable por ser altamente citotóxico. Esto significa que la cantidad óptima de DNA que debe ser utilizada es de 0.53 μg por cm^2 de células sembradas en una monocapa y la cantidad óptima de PEI25 debe ser de 1.59 μg por cm^2 de células sembradas en una monocapa.

Tabla 8. Porcentaje de células que expresan EGFP. En la tabla se muestran los datos obtenidos de 3 repeticiones en tiempos distintos de transfecciones hechas en células DF-1 con PEI25. Estos ensayos fueron realizados en frascos T-25 y los datos obtenidos por citometría de flujo.

Repeticiones	Proporción DNA/PEI25						
	1:1	1:1.5	1:2	1:2.5	1:3	1:3.5	C(-)
1	45.06	48.27	49.94	53.24	63.62	53.85	0.23
2	47.02	47.08	44.82	49.57	58.22	58.47	0.34
3	47.77	50.71	47.44	52.35	61.37	60.05	0.18
Promedio	46.62	48.69	47.40	51.72	61.07	57.46	0.25

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0146
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
Kruskal-Wallis statistic	14.17
Data summary	
Number of treatments (columns)	6
Number of values (total)	18

Fig. 18: Análisis estadístico Kruskal-Wallis entre los grupos transfectados con PEI25. Se observa un valor p (P value) de 0.0146, el cual es menor a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula de que las medianas de los grupos son iguales y se asume que por lo menos hay un par de grupos con medianas significativamente diferentes entre sí.

Tabla 9: Diferencia de medianas entre los grupos de células transfectadas. Se muestran los valores p de la comparación de medianas calculados a través de la prueba no paramétrica para muestras independientes U de Mann-Whitney. Los casilleros resaltados en azul indican los grupos con un valor p significativo.

Valor p		Proporción DNA/PEI25					
		1:1	1:1.5	1:2	1:2.5	1:3	1:3.5
Proporción DNA/PEI25	1:1	-					
	1:1.5	0.100	-				
	1:2	0.450	0.350	-			
	1:2.5	0.050	0.100	0.100	-		
	1:3	0.050	0.050	0.050	0.050	-	
	1:3.5	0.050	0.050	0.050	0.050	0.200	-
	C(-)	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050

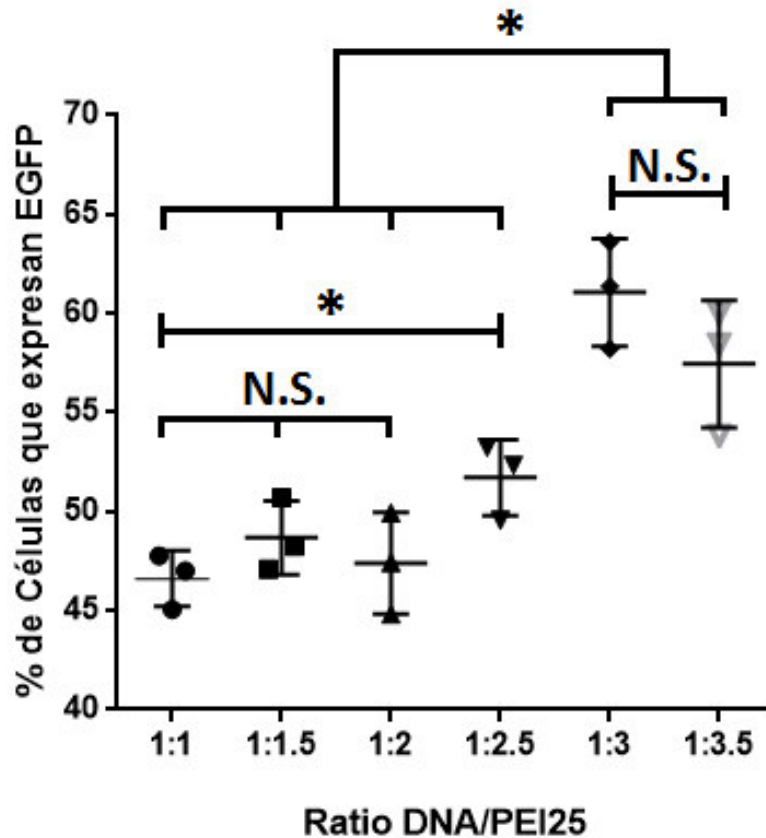


Fig. 19: Eficiencia de transfección con distintas proporciones de DNA/PEI25. Para cada tratamiento se hicieron 3 ensayos independientes donde la eficiencia de transfección fue medida en % de células que expresan EGFP. El asterisco indica un $p \leq 0.05$ y N.S. indica No significaticancia entre las medianas.

5.3 Análisis de la expresión y ensamblaje de VLP

Una vez determinada las cantidades óptimas de PEI25 y DNA que se deben usar por cm^2 para transfectar las células DF-1, se escalaron estas condiciones para cotransfectar, al mismo tiempo, los plásmidos que generan los VLP en frascos T-225. Para evaluar si la presencia de las proteínas en los sobrenadantes purificados se debían a la formación de VLP y no a proteínas libres en el sobrenadante, los plásmidos fueron cotransfectados simultáneamente en tres combinaciones distintas (ver sección 4.2.3.1). Una vez hecha la cotransfección se recolectaron los sobrenadantes cada 2 días y se reemplazó el medio por medio fresco, durante 6 días. Los sobrenadantes fueron concentrados y purificados por ultracentrifugación, como es descrito en la sección 4.2.3.2. Finalmente, los VLP purificados fueron analizados por

Western blot utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas de NDV o contra la Fibrina-2.

El PEI25 mostró ser altamente citotóxico en la proporción DNA/PEI25 1:3 y utilizando 0.53 μg de DNA por cm^2 . Esto fue especialmente notorio al quinto y sexto día post transfección, como se muestra en la figura 20C y 20D, respectivamente. En este punto las células se agregaron de manera atípica de lo que se espera de un cultivo de células adherentes y además presentaron morfología redondeada. Las células no transfectadas fueron mantenidas en paralelo (figuras 20A y 20B), a las que también se les cambió el medio cada 2 días, para ser usadas de control.

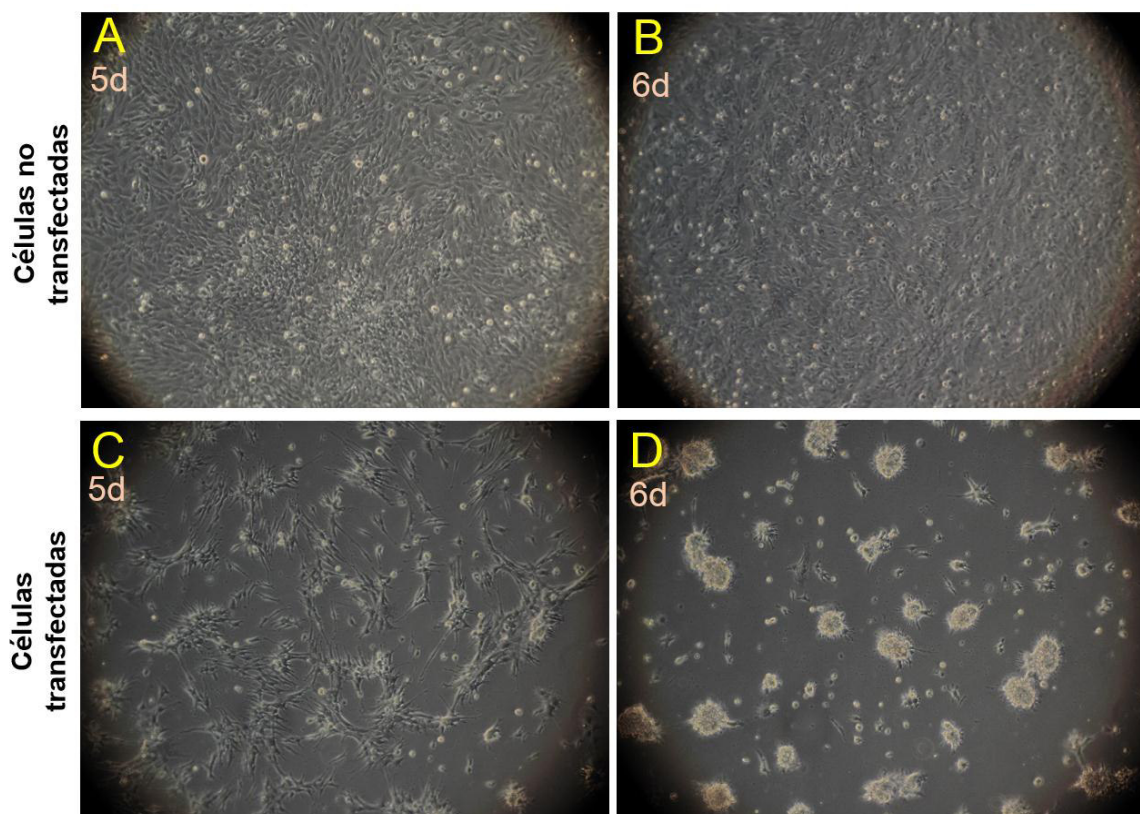


Fig. 20: Citotoxicidad del PEI25 en células DF-1. Comparación entre células no transfectadas y transfectadas al permanecer 5 ó 6 días de incubación. Todas las fotos fueron tomadas en un microscopio invertido a un aumento de 100X.

En la figura 21 se muestra el Western blot realizado contra las proteínas de NDV, donde se observa que solo en los carriles donde se expresó la proteína M se detectó la presencia de proteínas de NDV, mientras que en el

carril 2 proveniente de células que expresaron la proteína N y hnFib2 no se detectó la presencia de ninguna proteína de NDV en el sobrenadante purificado, ni siquiera la misma proteína N. Por otro lado, la proteína HN solo pudo ser detectada en el carril 1, que corresponde a partículas virales completas de NDV provenientes de fluido alantoideo. Los pesos moleculares de las proteínas de NDV concordaron con lo reportado por (Ge et al., 2011). La proteína M fue observada a un peso molecular de alrededor de 40kDa, la proteína N fue observada a alrededor de 55kDa y la proteína HN fue observada a alrededor de 75kDa, mientras que las demás proteínas que conforman el virión de NDV no pudieron ser claramente distinguidas.

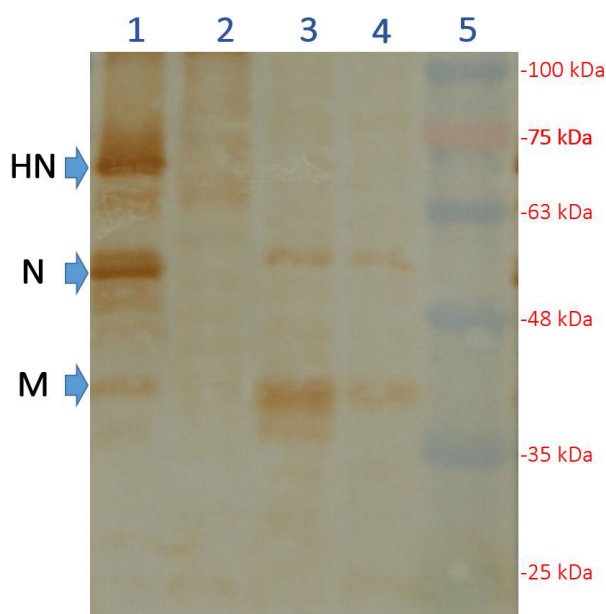


Fig. 21: Análisis de los VLP por Western blot usando suero anti-NDV. Carril 1, NDV cepa LaSota proveniente de fluido alantoideo; Carril 2, sobrenadante concentrado y purificado de células DF-1 transfectadas con los plásmidos pCI-N, pVAX1-hnFib2 y pVAX1; Carril 3, sobrenadante concentrado y purificado de células DF-1 transfectadas con los plásmidos pVAX1-M, pVAX1-hnFib2 y pVAX1; Carril 4, sobrenadante concentrado y purificado de células DF-1 transfectadas con los plásmidos pCI-N, pVAX1-M y pVAX1-hnFib2; Carril 5, Prism Ultra Protein Ladder (10-245 kDa).

En la figura 22 se muestra el western blot realizado contra un epítipo de la proteína Fibrin-2, donde se observa que solo en el carril 4, en el cual se expresó la proteína hnFib2 junto con las proteínas M y N, se detectó la presencia de la Fibrin-2. En el carril 2, en el que se expresaron las proteínas

N y hnFib2, no se pudo detectar la presencia de la Fibra-2. En los carriles 1 y 3, como se esperaba, tampoco se encontró presencia de la Fibra-2. El peso molecular esperado de la Fibra-2 es de 56 kDa (Schachner et al., 2014), por lo que la proteína hnFib2 debería tener la suma del peso molecular de la Fibra-2 más el peso molecular extra de los aminoácidos añadidos en el N-terminal, correspondientes a los DC y DT de la proteína HN (5.3 kDa), es decir un peso molecular total de 61.3 kDa. La banda γ en la figura 22 parece ser la proteína con el peso molecular esperado, sin embargo aparecen 2 bandas extras de peso molecular superior (α y β) que pueden corresponder a la misma proteína hnFib2 con modificaciones post-traduccionales. Además, se observa una banda extra de peso molecular inferior de unos 38 kDa (banda δ), que probablemente corresponde a un fragmento de la hnFib2.

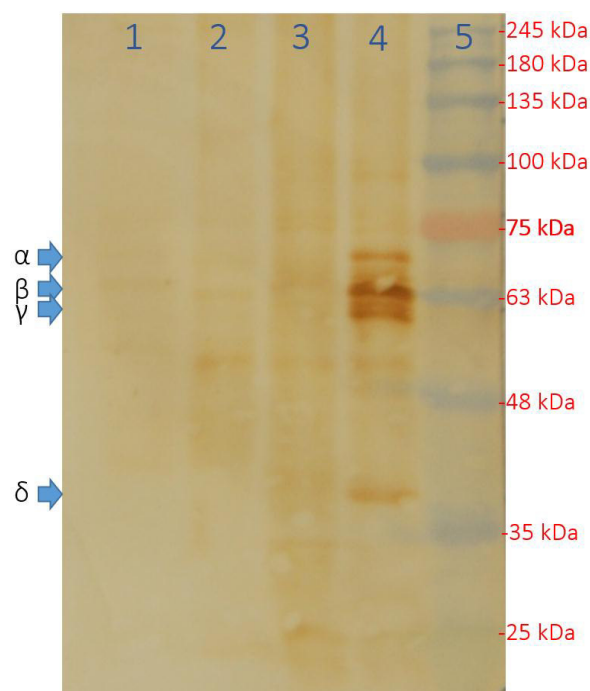


Fig. 22: Análisis de los VLP por Western blot usando suero anti-Fibra-2. Carril 1, NDV cepa LaSota proveniente de fluido alantoideo; Carril 2, sobrenadante concentrado y purificado de células DF-1 transfectadas con los plásmidos pCI-N, pVAX1-hnFib2 y pVAX1; Carril 3, sobrenadante concentrado y purificado de células DF-1 transfectadas con los plásmidos pVAX1-M, pVAX1-hnFib2 y pVAX1; Carril 4, sobrenadante concentrado y purificado de células DF-1 transfectadas con los plásmidos pCI-N, pVAX1-M y pVAX1-hnFib2; Carril 5, Prism Ultra Protein Ladder (10-245 kDa).

6. DISCUSIÓN

La presencia de la Fibr-2 en los VLP formados por la transfección de plásmidos que codifican las proteínas M, N y hnFib2 (figura 22) demuestra que se pueden generar VLPs de membrana lipídica a partir de una proteína de un virus que no posee membrana como lo es FAdV. Los VLPs son partículas de tamaño y morfología similar a los virus de los cuales proceden (Kushnir et al., 2012), por lo que en la metodología empleada en este trabajo se aprovechó esta característica para, a partir del sobrenadante de las células transfectadas, separar por varios pasos de concentración y purificación solo partículas con la densidad y tamaño esperado para los VLPs. Por otro lado, se ha reportado que la presencia de la proteína M es un requisito indispensable para la formación de VLPs de NDV (Pantua et al., 2006), esto explica porque se pudieron detectar proteínas de NDV solo cuando la proteína M estuvo presente, lo que no ocurrió cuando solo se expresaron las proteínas N y hnFib2 (ver figura 21).

La incorporación de glicoproteínas de superficie en la membrana de NDV se hace de manera selectiva, donde debe existir una eficiente interacción entre el dominio citoplasmático (DC) y la proteína M (Murawski et al., 2010; Pantua et al., 2006). En el caso de glicoproteínas de superficie de otros virus, esta interacción puede ser lograda al reemplazar el DC de la proteína que se quiere incorporar al virion por el DC de una de las proteínas de superficie de NDV (McGinnes & Morrison, 2013). Sin embargo, la Fibr-2 no es una glicoproteína de superficie que se ensambla en la membrana del virus o de la célula, ya que FAdV es un virus desnudo. Es por esto que hemos fusionado la secuencia no solo el DC, sino también el dominio transmembrana (DT) de la proteína HN a la Fibr-2, lo que permitirá que la Fibr-2 pueda incorporarse a la membrana de la célula y el virus. La proteína HN de NDV es una proteína transmembrana de clase II (Khattar et al., 2009), es decir la proteína atraviesa la membrana de la célula una sola vez por su región N-terminal. La proteína F de NDV es una proteína transmembrana de clase I (McGinnes et al., 2003), es decir atraviesa la membrana de la célula una sola vez por su región C-terminal. Por otro lado, la Fibr-2 de FAdV tiene el dominio globular de unión al receptor en la región C-terminal y el tallo de la proteína se encuentra en la región N-terminal (El

Bakkouri et al., 2008). Por lo tanto para mantener la estructura de la Fibra-2 lo más parecida a su estado nativo, se decidió fusionar el DC y el DT de la proteína HN de NDV en el extremo N-terminal de la Fibra-2, permitiendo así que el dominio globular de la Fibra-2 sea expuesto hacia afuera de los viriones formados. Sin embargo, si la estructura de la Fibra-2 es alterada o no por la incorporación de los DC y DT de la HN aún debe ser dilucidada en estudios futuros.

El análisis por Western blot, utilizando suero anti-Fibra-2, de los VLP formados con las proteínas M, N y hnFib2 mostró por lo menos 3 bandas más de lo esperado (ver figura 22). Las bandas α y β pueden corresponder a versiones de la proteína hnFib2 con modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones que tienden a modificar el patrón de migración durante la corrida en SDS-PAGE, aparentando un tamaño mayor al esperado (Magnelli et al., 2011), sin embargo esto debe ser probado. Por otro lado, la banda δ puede corresponder a una porción de la proteína hnFib2 generado por una proteasa celular que cortó esta proteína en fragmentos más pequeños, pero en todo caso la banda δ que corresponde al fragmento pequeño se encuentra en mucho menor proporción que las otras bandas, por lo que parece no haber afectado la expresión de la hnFib2 en el tamaño esperado.

En este trabajo se encontró una eficiencia media de transfección de 61.07% (medida en porcentaje de células que expresan EGFP) utilizando 0.53 μg de DNA plasmídico por cm^2 a una proporción óptima de DNA/PEI25 de 1:3, lo que implica utilizar 1.59 μg de PEI25 por cm^2 . Esto indica que el PEI25 ramificado puede ser usado como un vehículo eficiente para introducir DNAs que expresen proteínas en células aviares, sin embargo esta expresión solo puede ser transitoria debido a que este reactivo es sumamente citotóxico, como se muestra en las figuras 20C y 20D. La citotoxicidad del PEI 25 ramificado no solo ha sido observada en células aviares, sino que también se ha observado en diferentes líneas celulares (Dong et al., 2007; Kafil & Omid, 2011; Moghimi et al., 2005). El mecanismo por el cual el PEI25 genera citotoxicidad ha sido estudiado, en varios tipos celulares de origen humano, por Moghimi et al. (2005), quienes observaron que inicialmente (a los 30 minutos) el PEI25 causa

daños en la membrana celular, liberando moléculas intracelulares hacia el medio extracelular. Luego en una segunda etapa (24 horas) se activa el programa de apoptosis mediado por la mitocondria, resultando en la formación de canales inducidos por el PEI en la membrana externa de la mitocondria. Esto conduce a la liberación del citocromo c proapoptótico, la subsecuente activación de la caspasa-3 y en la alteración en el potencial de membrana de la mitocondria (Moghimí et al., 2005). Si bien estos mecanismos fueron descritos para células de origen humano, probablemente un mecanismo similar puede ser la causa de la citotoxicidad en células aviares, sin embargo esto debe ser probado.

A pesar de los avances en el desarrollo de vacunas contra HCl-SPH aún hay un largo camino que recorrer antes de obtener una vacuna que cumpla con los requerimientos de protección y cuyos costos de producción se ajusten a las necesidades de la industria avícola. Los VLP generados aquí pueden ser una buena alternativa que permita cumplir con estos requerimientos. Por un lado, ha sido demostrado que un mínimo de 20-25 epítopes espaciados por 5-10 nm son suficientes para la activación óptima de células B (Dintzis et al., 1982; Jennings & Bachmann, 2008). Por otro lado, también se ha demostrado la importancia de la proteína Fibra-2 en la entrada y patogenicidad del virus, sin embargo cada partícula viral de FAdV solo tiene 12 de estas proteínas, ubicadas en los vértices de la cápside. Los VLP generados aquí deberían tener cientos o miles de repeticiones de la Fibra-2 en toda la superficie de su envoltura, por lo que debería inducir una fuerte activación de células B que permita generar anticuerpos contra esta proteína, que probablemente neutralicen el virus, a diferencia de una cápside donde la presencia de Fibra-2 es escasa.

Los VLP, debido al gran potencial que tienen para exponer antígenos al sistema inmune, han demostrado que pueden ser capaces de conferir protección contra varias enfermedades virales, también contra enfermedades no virales como candidiasis y malaria, e incluso son usados para tratar enfermedades no infecciosas como el Alzheimer, diabetes mellitus tipo II, cáncer y otras (Kushnir et al., 2012). Actualmente, algunos VLPs han entrado a

fase clínica de evaluación y otros pocos tienen licencia y son comercializados (Kushnir et al., 2012). Dentro de las vacunas de subunidades los VLP son los que han alcanzado mayor éxito y aunque todavía no existen VLP comercialmente disponibles para patógenos veterinarios (Liu et al., 2012), las investigaciones en este campo aumentan cada año y es de esperarse que en los próximos años sea autorizado un VLP para una enfermedad veterinaria. En la presente investigación, se ha demostrado por primera vez que es posible generar VLPs de envoltura lipídica para FAdV-4, el cual no posee envoltura, por lo que este trabajo podrá ser extrapolado para otros adenovirus e incluso para otro tipo de virus desnudos. Esta investigación es un paso importante hacia el desarrollo de vacunas alternativas, más seguras y eficientes, para prevenir la aparición de brotes de HCI-SHP en aves de corral, tanto en el Perú como en otros países. Sin embargo, la eficacia de estos VLPs como posibles vacunas contra FAdV debe ser evaluada en ensayos experimentales con aves.

7. CONCLUSIONES

- Se pueden obtener VLPs con envoltura para virus desnudos, como FAdV-4.
- La obtención de VLPs con envoltura que contengan la Fibr-2 de FAdV-4 se puede realizar a través de la co-expresión de las proteínas M y N de NDV junto con la proteína quimérica hnFib2.
- La fusión de los dominios citoplasmático y transmembrana de la proteína HN de NDV al extremo N-terminal de la Fibr-2 permitió su incorporación a los VLP de NDV.
- El PEI25 puede ser utilizado como vehículo para la introducción de DNA foráneo a las células aviares DF-1 de manera eficiente, pero debido a su alta citotoxicidad solo debe usarse para expresar proteínas de manera transitoria y no establemente.
- Los vectores plasmídicos construidos expresaron exitosamente las proteínas de interés, como fue evidenciado por fluorescencia (EGFP) o por western blot (proteínas N, M y hnFib-2).

8. RECOMENDACIONES:

- Determinar por microscopía electrónica de transmisión la presencia y densidad de la Fibr-2 en la superficie de los VLP generados.
- Probar *in vivo*, con un ensayo en aves, la eficacia como vacuna de los VLP generados aquí, a través de la tasa de supervivencia ante un desafío letal, título de anticuerpos neutralizantes y evaluación de la respuesta celular específica contra una cepa virulenta de FAdV-4.
- Utilizar un sistema de expresión de proteínas en levadura, células de insecto, aviares o de mamíferos para lograr una producción sostenida y escalable de estos VLPs.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, M.-D., Zaman, S., & Anjum, M. A. (2009). Comparative study on the pathogenicity of liver homogenate and cell culture propagated Hydropericardium syndrome virus in broiler birds. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 3(2), 56–63.
- Asthana, M., Chandra, R., & Kumar, R. (2013). Hydropericardium syndrome: current state and future developments. *Archives of Virology*, 158(5), 921–931. <http://doi.org/10.1007/s00705-012-1570-x>
- ATCC Cat. CRL-12203. (n.d.). UMNSAH/DF-1 ATCC[®] CRL-12203[™] Gallus gallus embryo. Retrieved October 29, 2015, from <http://www.atcc.org/products/all/CRL-12203.aspx#characteristics>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, 2 Volume Set* (Vol. 2). John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471250929.html>
- Chroboczek, J., Szurgot, I., & Szolajska, E. (2014). Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), 531–539.
- Di Gioia, S., & Conese, M. (2009). Polyethylenimine-mediated gene delivery to the lung and therapeutic applications. *Drug Design, Development and Therapy*, 2, 163–188.
- Dintzis, R. Z., Vogelstein, B., & Dintzis, H. M. (1982). Specific cellular stimulation in the primary immune response: experimental test of a quantized model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(3), 884–888.
- Dong, W., Li, S., Jin, G., Sun, Q., Ma, D., & Hua, Z. (2007). Efficient Gene Transfection into Mammalian Cells Mediated by Cross-linked Polyethylenimine. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(2), 81–102.
- El Bakkouri, M., Seiradake, E., Cusack, S., Ruigrok, R. W. H., & Schoehn, G. (2008). Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 short fibre. *Virology*, 378(1), 169–176. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.011>
- Ge, J., Wang, X., Tao, L., Wen, Z., Feng, N., Yang, S., ... Bu, Z. (2011). Newcastle disease virus-vectored rabies vaccine is safe, highly immunogenic, and provides long-lasting protection in dogs and cats. *Journal of Virology*, 85(16), 8241–8252. <http://doi.org/10.1128/JVI.00519-11>
- Gelderblom, H., & Maichle-Lauppe, I. (1982). The fibers of fowl adenoviruses. *Archives of Virology*, 72(4), 289–298.

- Gogoi, P., Ganar, K., & Kumar, S. (2015). Avian Paramyxovirus: A Brief Review. *Transboundary and Emerging Diseases*. <http://doi.org/10.1111/tbed.12355>
- Grgacic, E. V. L., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods (San Diego, Calif.)*, 40(1), 60–65. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.018>
- Grgić, H., Poljak, Z., Sharif, S., & Nagy, É. (2013). Pathogenicity and Cytokine Gene Expression Pattern of a Serotype 4 Fowl Adenovirus Isolate. *PLoS ONE*, 8(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077601>
- Gu, H., Li, T., Han, L., Zhu, P., Zhang, P., Zhang, S., ... Yang, P. (2015). Protection conferred by virus-like particle vaccines against respiratory syncytial virus infection in mice by intranasal vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(4), 1057–1064. <http://doi.org/10.1080/21645515.2015.1011993>
- Hafez, H. M. (2011). Avian Adenoviruses Infections with Special Attention to Inclusion Body Hepatitis/ Hydropericardium Syndrome and Egg Drop Syndrome. *Pakistan Veterinary Journal*, 31(2), 85–92.
- Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T., & Eshleman, J. R. (2013). Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(9), 1296–1303. <http://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>
- Harrison, M. S., Sakaguchi, T., & Schmitt, A. P. (2010). Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(9), 1416–1429. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.005>
- Henel, G., & Schmitz, J. L. (2007). Basic Theory and Clinical Applications of Flow Cytometry. *Lab Medicine*, 38(7), 428–436. <http://doi.org/10.1309/GHLEWLV0CD8025JL>
- Hess, M. (2000). Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 29(3), 195–206. <http://doi.org/10.1080/03079450050045440>
- Hess, M., Cuzange, A., Ruigrok, R. W., Chroboczek, J., & Jacrot, B. (1995). The avian adenovirus penton: two fibres and one base. *Journal of Molecular Biology*, 252(4), 379–385.
- Hines, N. L., & Miller, C. L. (2012). Avian paramyxovirus serotype-1: a review of disease distribution, clinical symptoms, and laboratory diagnostics. *Veterinary Medicine International*, 2012, 708216. <http://doi.org/10.1155/2012/708216>
- ICTV Virus Taxonomy 2014. (n.d.). Retrieved October 28, 2015, from <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>

- Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*, 389(5), 521–536.
- Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., & He, N. (2014). Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*, 4(3), 240–255. <http://doi.org/10.7150/thno.6914>
- Kafil, V., & Omid, Y. (2011). Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *BioImpacts: BI*, 1(1), 23–30. <http://doi.org/10.5681/bi.2011.004>
- Khan, A. a., Sabri, A. n., Mansoor, M. k., & Hussain, I. (2005). Hydropericardium syndrome in Pakistan: a review. *World's Poultry Science Journal*, 61(04), 647–654. <http://doi.org/10.1079/WPS200576>
- Khattar, S. K., Yan, Y., Panda, A., Collins, P. L., & Samal, S. K. (2009). A Y526Q mutation in the Newcastle disease virus HN protein reduces its functional activities and attenuates virus replication and pathogenicity. *Journal of Virology*, 83(15), 7779–7782. <http://doi.org/10.1128/JVI.00536-09>
- Krammer, F., & Palese, P. (2015). Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(3), 167–182. <http://doi.org/10.1038/nrd4529>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31(1), 58–83. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
- Liu, F., Ge, S., Li, L., Wu, X., Liu, Z., & Wang, Z. (2012). Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 553–559. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.10.018>
- Ludwig, C., & Wagner, R. (2007). Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 537–545. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.013>
- Magnelli, P. E., Bielik, A. M., & Guthrie, E. P. (2011). Identification and Characterization of Protein Glycosylation using Specific Endo- and Exoglycosidases. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (58). <http://doi.org/10.3791/3749>
- Mase, M., Nakamura, K., & Imada, T. (2010). Characterization of Fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens with hydropericardium syndrome based on analysis of the short fiber protein gene. *Journal of*

- McGinnes, L. W., Gravel, K. A., Finberg, R. W., Kurt-Jones, E. A., Massare, M. J., Smith, G., ... Morrison, T. G. (2011). Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins. *Journal of Virology*, 85(1), 366–377. <http://doi.org/10.1128/JVI.01861-10>
- McGinnes, L. W., & Morrison, T. G. (2013). Newcastle disease virus-like particles: preparation, purification, quantification, and incorporation of foreign glycoproteins. *Current Protocols in Microbiology*, 30, Unit 18.2. <http://doi.org/10.1002/9780471729259.mc1802s30>
- McGinnes, L. W., Reitter, J. N., Gravel, K., & Morrison, T. G. (2003). Evidence for mixed membrane topology of the newcastle disease virus fusion protein. *Journal of Virology*, 77(3), 1951–1963.
- Moghim, S. M., Symonds, P., Murray, J. C., Hunter, A. C., Debska, G., & Szeewczyk, A. (2005). A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*, 11(6), 990–995. <http://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.02.010>
- Morrison, T. G. (2010). Newcastle disease virus-like particles as a platform for the development of vaccines for human and agricultural pathogens. *Future Virology*, 5(5), 545–554. <http://doi.org/10.2217/fvl.10.50>
- Murawski, M. R., McGinnes, L. W., Finberg, R. W., Kurt-Jones, E. A., Massare, M. J., Smith, G., ... Morrison, T. G. (2010). Newcastle disease virus-like particles containing respiratory syncytial virus G protein induced protection in BALB/c mice, with no evidence of immunopathology. *Journal of Virology*, 84(2), 1110–1123. <http://doi.org/10.1128/JVI.01709-09>
- Oshop, G. L., Elankumaran, S., Vakharia, V. N., & Heckert, R. A. (2003). In ovo delivery of DNA to the avian embryo. *Vaccine*, 21(11-12), 1275–1281.
- Pallister, J., Wright, P. J., & Sheppard, M. (1996). A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses. *Journal of Virology*, 70(8), 5115–5122.
- Pantua, H. D., McGinnes, L. W., Peebles, M. E., & Morrison, T. G. (2006). Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles. *Journal of Virology*, 80(22), 11062–11073. <http://doi.org/10.1128/JVI.00726-06>
- Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55(5), 856–866. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>

- Philippe, C., Grgić, H., Ojkić, D., & Nagy, E. (2007). Serologic monitoring of a broiler breeder flock previously affected by inclusion body hepatitis and testing of the progeny for vertical transmission of fowl adenoviruses. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Vétérinaire*, 71(2), 98–102.
- Roy, P., & Noad, R. (2009). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 655, 145–158. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1132-2_11
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning - Vol. 1, 2, 3* (Third, Vols. 1–3). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from https://drive.google.com/file/d/0B1hAm70ReNa7QWVDbDZVeJ4SFk/view?pli=1&usp=embed_facebook
- San Martín, C. (2012). Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses*, 4(5), 847–877. <http://doi.org/10.3390/v4050847>
- Schachner, A., Marek, A., Jaskulska, B., Bilic, I., & Hess, M. (2014). Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS). *Vaccine*, 32(9), 1086–1092. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.056>
- Schonewille, E., Jaspers, R., Paul, G., & Hess, M. (2010). Specific-pathogen-free chickens vaccinated with a live FAdV-4 vaccine are fully protected against a severe challenge even in the absence of neutralizing antibodies. *Avian Diseases*, 54(2), 905–910. <http://doi.org/10.1637/8999-072309-Reg.1>
- SENASA. (n.d.). Enfermedades *Notificables*. Retrieved October 28, 2015, from <http://www.senasa.gob.pe/senasa/6398-2/>
- Shah, M. S., Ashraf, A., Rahman, M., Khan, M. I., & Qureshi, J. A. (2012). A subunit vaccine against hydropericardium syndrome using adenovirus penton capsid protein. *Vaccine*, 30(50), 7153–7156. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.013>
- Singh, M., & Srivastava, I. K. (2011). *Development of Vaccines: From Discovery to Clinical Testing*. John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470256370.html>
- Steer, P. A., Kirkpatrick, N. C., O'Rourke, D., & Noormohammadi, A. H. (2009). Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 311–321. <http://doi.org/10.1128/JCM.01567-08>
- Taharaguchi, S., Fukazawa, R., Kitazume, M., Harima, H., Taira, K., Oonaka, K., & Hara, M. (2012). Biology of fowl adenovirus type 1 infection of heterologous cells. *Archives of Virology*, 157(11), 2223–2226. <http://doi.org/10.1007/s00705-012-1413-9>

- Tan, P. K., Michou, A. I., Bergelson, J. M., & Cotten, M. (2001). Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 6), 1465–1472. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-82-6-1465>
- ViralZone: Avulavirus. (n.d.). Retrieved October 28, 2015, from http://viralzone.expasy.org/all_by_species/84.html
- Zadravec, M., Slavec, B., Krapež, U., Kaján, G., Račnik, J., Juntos, P., ... Zorman-Rojs, O. (2011). Inclusion body hepatitis associated with fowl adenovirus type 8b in broiler flock in Slovenia: a case report. *Slovenian Veterinary Research*, 48(3/4), 107–113.

10. ANEXOS :

ANEXO 1

Preparación de *Buffers* para Ultracentrifugación

B. *Buffer* TNE

25mM Tris-HCl, pH 7.4
150mM NaCl
5mM EDTA
Filtrar por un filtro de 0.22µm y alicuotar

B. Solución 80% sucrosa (100mL)

80g Sucrosa
Buffer TNE hasta llegar a 100ml (*)
Filtrar por un filtro de 0.22µm y alicuotar
(*) Disolver por agitación fuerte, ya que esta cantidad de sucrosa esta cerca al punto de saturación, de ser necesario mantener en agitación a 37°C por 30min.

C. Solución 65% sucrosa (100mL)

65g Sucrosa
Buffer TNE hasta llegar a 100ml
Filtrar por un filtro de 0.22µm y alicuotar

D. Solución 50% sucrosa (100mL)

50g Sucrosa
Buffer TNE hasta llegar a 100ml
Filtrar por un filtro de 0.22µm y alicuotar

E. Solución 20% sucrosa (100mL)

20g Sucrosa
Buffer TNE hasta llegar a 100ml
Filtrar por un filtro de 0.22µm y alicuotar

F. Solución 10% sucrosa (100mL)

10g Sucrosa
Buffer TNE hasta llegar a 100ml
Filtrar por un filtro de 0.22µm y alicuotar

ANEXO 2

Preparación de *Buffers* para Western Blot

A. *Buffer* de carga 5X

250mM Tris-Cl, pH 6.8
10% SDS
30% Glicerol
0.02% Azul de bromofenol
5% β -mercaptoetanol

Preparación: Disolver el Azul de bromofenol en H₂O, luego agregar el Tris-Cl y el glicerol. Agregar al final el SDS y el β -mercaptoetanol. Alicuotar y guardar a -20°C

B. *Buffer* de Electroforesis 5X (1L)

Tris base 15.1 g
Glicina 93.8 g
SDS al 10% (w/v) 50 mL

Preparación: Disolver el Tris base y la glicina en 900 ml de H₂O, luego agregar el SDS al 10%, ajustar el pH a 8.3 y llevar la solución a un volumen final de 1000 ml. Para preparar 1L de *Buffer* de electroforesis al 1X, mezclar 200 ml de la solución 5X y 800 ml de H₂O.

C. *Buffer* de Transferencia (2L)

Tris base 6.07 g
Glicina 28.83 g
Metanol 200 mL

Preparación: Disolver el Tris base y la glicina en 1200 mL de H₂O, de requerirse ajustar el pH a 8.3-8.4, luego agregar el metanol y llevar la solución a un volumen final de 2L.

D. *Buffer* TTBS

10mM Tris-Cl, pH 7.4
150mM NaCl
0.1% Tween 20

Preparación: Disolver el NaCl en H₂O y agregar el Tris-Cl, luego agregar el Tween 20.

E. *Buffer* de Bloqueo (100 ml)

2 g BSA
100 ml *buffer* TTBS

Preparación: Disolver el BSA en el *buffer* TTBS y filtrar.